

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR PATHOLOGIE  
DIREKTOR: PROF. DR. MED. F. HOFSTÄDTER  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Untersuchung molekularer Therapie-Response-Marker bei lokal  
fortgeschrittenen Harnblasenkarzinomen mit adjuvanter Chemotherapie**

Inaugural – Dissertation  
Zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnmedizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Christina Leicht

2012



AUS DEM LEHRSTUHL FÜR PATHOLOGIE  
DIREKTOR: PROF. DR. MED. F. HOFSTÄDTER  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Untersuchung molekularer Therapie-Response-Marker bei lokal  
fortgeschrittenen Harnblasenkarzinomen mit adjuvanter Chemotherapie**

Inaugural – Dissertation  
Zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnmedizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Christina Leicht

2012

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1.Berichterstatter:	Prof. Dr. Arndt Hartmann
2.Berichterstatter:	Prof. Dr. Wolf F. Wieland
Tag der mündlichen Prüfung:	31.07.2012

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1</b>	<b>Anatomie der Harnblase.....</b>	<b>7</b>
1.1.1	Makroskopisch .....	7
1.1.2	Mikroskopisch .....	8
<b>1.2</b>	<b>Das Harnblasenkarzinom .....</b>	<b>10</b>
1.2.1	Epidemiologie .....	10
1.2.2	Ätiologie .....	10
1.2.2.1	Aromatische Amine .....	10
1.2.2.2	Nikotinkonsum .....	11
1.2.2.3	Medikamente .....	12
1.2.2.4	Chronische Harnwegsinfekte .....	12
1.2.3	Lokalisation .....	13
1.2.4	Morphologie.....	14
1.2.4.1	Präneoplasien .....	14
1.2.4.2	Neoplasien.....	16
1.2.5	TNM-Klassifikation und Grading.....	20
<b>1.3</b>	<b>Molekulargenetik .....</b>	<b>23</b>
1.3.1	Tumorsuppressorgene .....	24
1.3.2	Onkogene .....	27
1.3.3	FGFR3 Mutationen .....	28
1.3.4	PIK3CA Mutationen .....	29
1.3.5	Chromosom 9 und 17 .....	30
1.3.6	Modell der Pathogenese des Urothelkarzinoms .....	32
1.3.7	Klonalität multifokaler Harnblasenkarzinome .....	33
<b>1.4</b>	<b>Therapieoptionen beim fortgeschrittenen Harnblasenkarzinom .....</b>	<b>35</b>
1.4.1	Adjuvante Chemotherapie nach dem MVAC-Schema .....	36
1.4.2	Adjuvante Chemotherapie nach dem Cisplatin-Schema .....	37
<b>1.5</b>	<b>Studie der Arbeitsgemeinschaft für Urologische Onkologie AUO-AB 05/95 .....</b>	<b>38</b>
<b>1.6</b>	<b>Prädiktive Faktoren fürs Überleben und Chemo-Ansprechen beim Harnblasenkarzinom .....</b>	<b>39</b>
1.6.1	Klassische klinisch-pathologische Faktoren .....	39
1.6.2	Molekulare Prognosemarker .....	40
<b>1.7</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>42</b>
<b>2</b>	<b>Materialien und Methoden .....</b>	<b>43</b>
<b>2.1</b>	<b>Vorliegendes Material.....</b>	<b>43</b>
<b>2.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>44</b>
2.2.1	Gewinnung von DNA aus Paraffinmaterial .....	44
2.2.3	Mikrodissektion und DNA-Isolierung .....	45
2.2.4	PCR .....	46
2.2.5	Herstellung der Tissue Microarrays (TMAs) .....	49
2.2.5.1	Auswählen und Markieren der Gewebeareale .....	49
2.2.5.2	Herstellung der Gewebestanken .....	50
2.2.5.3	Zuordnung und Archivierung .....	51
2.2.5.4	Gewebepräparation und Antigendarstellung .....	51
2.2.6	Immunhistochemie .....	53
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>54</b>
<b>3.1</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>54</b>
3.1.1	Klinisch pathologische Daten .....	54

3.1.2	Immunhistochemische Analysen .....	59
3.1.3	Emmprinexpression im Bezug zu klinisch-pathologischen Daten und zu anderen immunhistochemischen Markern.....	61
3.1.4	Überlebensanalysen.....	62
3.1.4.1	Univariate Analysen .....	62
3.2.1.1	Multivariate Analysen .....	66
3.2	Diskussion .....	69
3.2.1	Verwendung von Tissue-Microarrays .....	69
3.2.2	Verwendung von klassischen histopathologischen Prognosemarkern .....	71
3.2.3	Verwendung von molekularen Prognosemarkern.....	72
4	Zusammenfassung und Ausblick .....	78
5	Literaturverzeichnis.....	80
6	Abbildungsverzeichnis .....	92
7	Tabellenverzeichnis .....	93
8	Anhang .....	94
8.1	Danksagung.....	94
8.2	Curriculum vitae .....	95
8.3	Eidesstattliche Erklärung .....	96

# 1 Einleitung

## 1.1 Anatomie der Harnblase

### 1.1.1 Makroskopisch

Die Harnblase, Vesica urinaria, ist ein Hohlorgan, welches sub- bzw. peritoneal hinter der Symphyse liegt und dem Beckenboden aufsitzt.

Anatomisch unterscheidet man den Harnblasenkörper, corpus vesicae, kranial, den von Peritoneum überzogenen, apex vesicae, nach unten den Blasengrund, fundus vesicae und den Blasen Hals, collum vesicae. Die beiden Ureteren münden seitlich hinten in den Blasengrund.

Die Mündungsstelle der Ureteren bezeichnet man als Ureterostien. Der Blasen Hals führt in den Harnleiter. Der dreieckige Bereich zwischen den Ostien und der Urethra nennt man Trigonum vesicae. Hier ist die Schleimhaut mit der darunterliegenden Muskelschicht fest verwachsen, d.h. hier findet man auch bei leerer Blase keine Falten. Arteriell wird die Harnblase über die A. vesicalis inferior und die A. vesicalis superior aus der A. iliaca int. versorgt. Ihre Innervation erfolgt von den Ästen des Sympathicus und Parasympathicus (Benninghoff 1993).

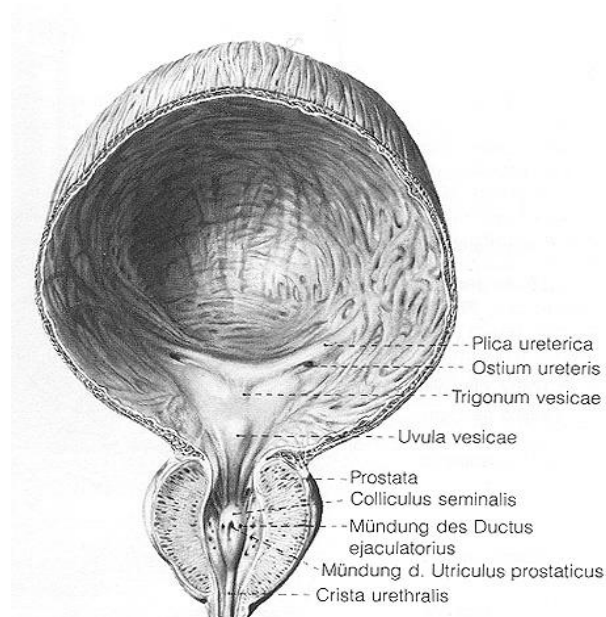


Abbildung 1-1: Schematischer Querschnitt durch die männliche Harnblase (Benninghoff 1993)

### 1.1.2 Mikroskopisch

Mikroskopisch entspricht der Wandbau der Harnblase dem der Nierenbecken und dem der Ureteren. Die Wand besteht hier aus drei Schichten, der Tunica mucosa mit Urothel und Lamina propria, der Tunica muscularis und Tunica adventitia.

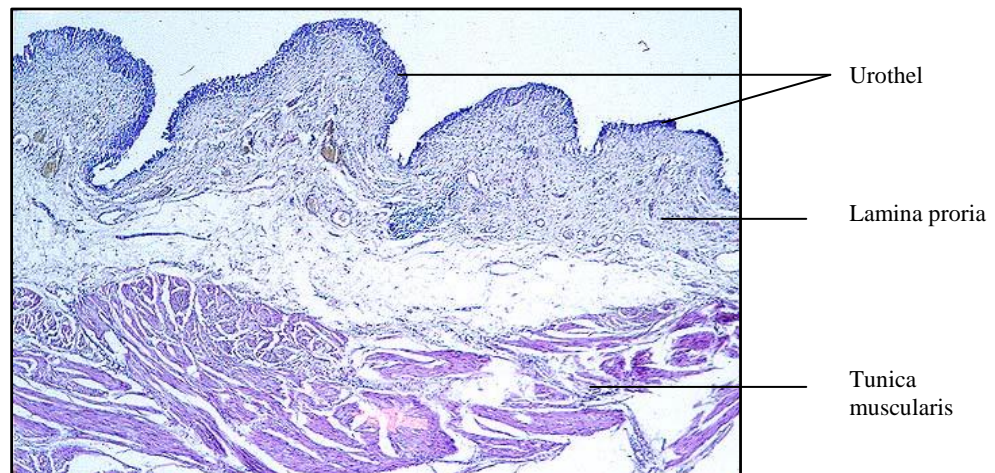


Abbildung 1-2: Querschnitt durch die Harnblasenwand; Hämatoxilin/Eosin-Färbung; x20

#### Tunica mucosa

Das Urothel kleidet die Harnblase luminal aus. Hierbei handelt es sich um ein mehrreihiges bis mehrschichtiges Epithel, welches typisch für die ableitenden Harnwege ist. Es besteht aus vier bis sechs Zellschichten, die man in Basal-, Intermediär-, und Deckzellen unterscheiden kann. Die untersten Zellen sind kuboid, die mittleren polygonal und die oberen, oft mehrkernigen Zellen, sind abgerundet und wölben sich ins Lumen hinein.

Die oberen Deckzellen haben zum Teil Ausläufer hinunter zur Basalmembran und werden wegen ihrer Form auch als „umbrella cells“ bezeichnet. Ihre Aufgabe ist es gegen den zelltoxischen Harn eine Barriere zu bilden. Dies wird zum einen durch gut ausgebildete Zellkontakte (zonulae occludentes), zum anderen durch eine plattenartige Verdichtung der Zellmembran („Krusta“) ermöglicht.

Aufgrund dieser besonderen Architektur kann sich das Urothel den verschiedenen Füllungszuständen der Harnblase anpassen. Bei starker Dehnung erscheint es dann wie ein zwei- bis dreireihiges Plattenepithel.

Unter dem Urothel befindet sich die Lamina propria. Sie besteht aus lockerem Bindegewebe mit Einlagerungen von elastischen Fasern. Hierdurch kann sie sich ebenfalls an die



verschiedenen Dehnungszustände der Blase anpassen. Im Trigonum vesicae fehlt diese Schicht. Die Schleimhaut ist hier fest mit der Muskulatur verwachsen, so dass dieser Bereich auch bei gefüllter Blase faltenfrei ist.

### Tunica muscularis

An die Lamina propria schließt sich die Tunica muscularis an. Sie besteht aus glatter Muskulatur, welche für den peristaltischen Transport des Urins verantwortlich ist (M. detrusor vesicae). Die Muskelfasern sind in der Harnblase nicht in einer bestimmten Richtung geordnet. Nur am Blasen Hals kann man eine deutliche Dreischichtung erkennen: eine innere Schicht mit längs verlaufenden Fasern, in der Mitte quer verlaufende und außen wieder längs verlaufende Fasern.

Je nach Dehnungszustand der Blase ist auch die Muskelschicht unterschiedlich dick.

### Tunica adventitia

Von außen wird die Harnblase von der Tunica adventitia bedeckt. Diese besteht aus lockerem Bindegewebe, Blut- und Lymphgefäßen, sowie einem Plexus aus vegetativen Nervenfasern und zahlreichen eingelagerten Ganglien. Durch dieses Nerven Geflecht wird der Musculus detrusor vesicae sympathisch und parasympathisch innerviert.

## 1.2 Das Harnblasenkarzinom

### 1.2.1 Epidemiologie

Das Harnblasenkarzinom macht etwa 2% aller bösartigen Tumoren aus und ist mit einer Inzidenz von etwa 30 neuen Fällen pro Jahr pro 100.000 Einwohner der zweithäufigste Tumor im Urogenitaltrakt. Insgesamt erkranken somit in der BRD jährlich etwa 16.000 Patienten an diesem Tumor. Dabei haben die Männer ein dreifach höheres Erkrankungsrisiko als die Frauen.

Das Durchschnittsalter bei der Erstdiagnose liegt zwischen 65 und 70 Jahren, weniger als 1% der Harnblasenkarzinome treten bei Patienten unter 45 Jahren auf (Lehmann et al 2005).

Bei der Erstmanifestation ist bei 70% ein oberflächliches Harnblasenkarzinom festzustellen, bei 30% besteht eine Infiltration der Tunica muscularis, 15% haben bei der Erstdiagnose bereits Metastasen (Kataja et al 2005; Oosterlinck et al 2002).

Aufgrund dieses Tumors versterben in Deutschland jährlich circa 5000 Patienten (Giannopoulos et al 2000; Richie et al 1989). Im Vergleich zu den Entwicklungsländern in Schwarzafrika und Asien ist die Letalität in den westlichen Industrieländern größer (Helpap, 1993).

### 1.2.2 Ätiologie

Ätiologisch wurde das Harnblasenkarzinom gut untersucht. Als Hauptursache für die Urothelkarzinogenese gelten berufliche sowie außerberufliche Umwelteinflüsse, Rauchen, Medikamente und chronische Harnwegsinfekte. Die Schwierigkeit beim Nachweis der Tumorausache liegt vor allem in der langen Latenzzeit (10 bis 40 Jahre) zwischen Exposition und Tumorentstehung.

#### 1.2.2.1 Aromatische Amine

Bereits 1938 wurde von Hueper et al in einem Tierexperiment nachgewiesen, dass durch 2-Naphtylamin, welches zur Gruppe der aromatischen Amine gehört, ein Blasentumor verursacht werden kann. Vor allem Personen, die in der Textil-, Leder- und Farbstoffindustrie

arbeiten sind einer erhöhten Exposition von aromatischen Aminen ausgesetzt. Man schätzt, dass etwa 25% der Harnblasenkarzinome durch beruflich bedingten Kontakt zu diesen kanzerogenen Substanzen entstehen. Dabei werden die Karzinogene über den Magen-Darm-Trakt, die Lunge oder die Haut aufgenommen. Die Blasentumorerkrankung ist in den genannten Branchen als Berufskrankheit anerkannt (Lehmann et al 2005; Rübber 1997)

<b>Blasenkarzinogene</b>
- 2-Naphthylamin
- Benzidin
- 4-Aminobiphenyl
- Dichlorbenzidin
- Orthodianisidin
- Phenacetin
- Chlornaphazin
- Cyclophosphamid
- 44-Methylen-2-chloranilin
- Auramin
- Magenta
- Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe

Tabelle 1-1: Für den Menschen gesicherte Blasenkarzinogene aus der Gruppe der aromatischen Amine (Vineis et al 1997)

### 1.2.2.2 Nikotinkonsum

Das Risiko an einem Blasentumor zu erkranken ist für Raucher im Vergleich zu Nichtrauchern, je nach Literatur, um das zwei- bis sechsfache erhöht (Cole 1971; Kunze et al 1986; Brennan et al 2000). Man führt in etwa 50 bis 80% der Blasenkarzinome auf den Nikotinkonsum zurück. Hierbei steigt das Erkrankungsrisiko mit der Dauer des Zigarettenkonsums und Anzahl der pro Tag gerauchten Zigaretten. Verantwortlich für die karzinogene Wirkung ist das im Zigarettenrauch enthaltene 2-Naphtylamin (Hoffmann et al 1969; Hecht et al 1976).

### 1.2.2.3 Medikamente

Folgende Medikamente werden für die Urothelkarzinogenese verantwortlich gemacht:

- Chlornaphazin: Dieses Medikament wurde bis 1963 zur Therapie der Polyzythämie eingesetzt. Es ist chemisch mit dem Beta-Naphtylamin verwandt.
- Phenacetin: Das Aminopholderivat wurde 1887 als Arzneistoff zur Schmerzbehandlung und Fiebersenkung eingeführt. Wegen seiner gesundheitsschädlichen Wirkung wurde es aber 1986 wieder aus dem Handel genommen. Phenacetin verursacht bei chronischer Einnahmen neben einer interstitiellen Nephritis auch Urothelkarzinome, vor allem im oberen Harntrakt. Verantwortlich hierfür ist ein Stickstoffhydroxylmetabolit des Phenacetins, welches von der chemischen Struktur ebenfalls ein aromatisches Amin darstellt.
- Cyclophosphamid: Fünf Prozent der mit diesem Zytostatikum behandelten Patienten entwickeln ein Harnblasenkarzinom mit überwiegend schlechter Prognose (Baker et al 1987). Seit mit MESNA (Mercapto-ethanolsulfat-Natrium) eine Zystitisprophylaxe eingeführt wurde, ist auch die kanzerogene Wirkung dieses Medikaments reduziert worden.

### 1.2.2.4 Chronische Harnwegsinfekte

Besonders Patienten mit einer jahrelangen Dauerkathetisierung haben ein erhöhtes Risiko für eine Plattenepithelkarzinomentstehung. In tropischen Ländern kann das Harnblasenkarzinom infolge einer Bilharziose auftreten. Mit dem Erreger *Schistosoma haematobium* kann man sich durch Trinken von verseuchtem Wasser infizieren oder wenn man darin badet. Als Ursache für die Tumorentstehung vermutet man eine infektionsbedingte Nitrosaminbildung.

### 1.2.3 Lokalisation

In der Harnblase findet man das Urothelkarzinom zu 46% an den Seitenwänden, zu 18% an der Blasen hinterwand, zu 13% am Trigonum, zu 9% am Blasendach, zu 8% an der Vorderwand und zu 6% am Blasen Hals. Es können jedoch auch multiple tumoröse Läsionen in verschiedenen Bereichen vorhanden sein. Neben der Harnblase sind auch das Nierenbecken, der Ureter und Divertikel häufige Entstehungsorte dieses Tumors. Oft sind diese auch miteinander kombiniert (Helpap 1993).

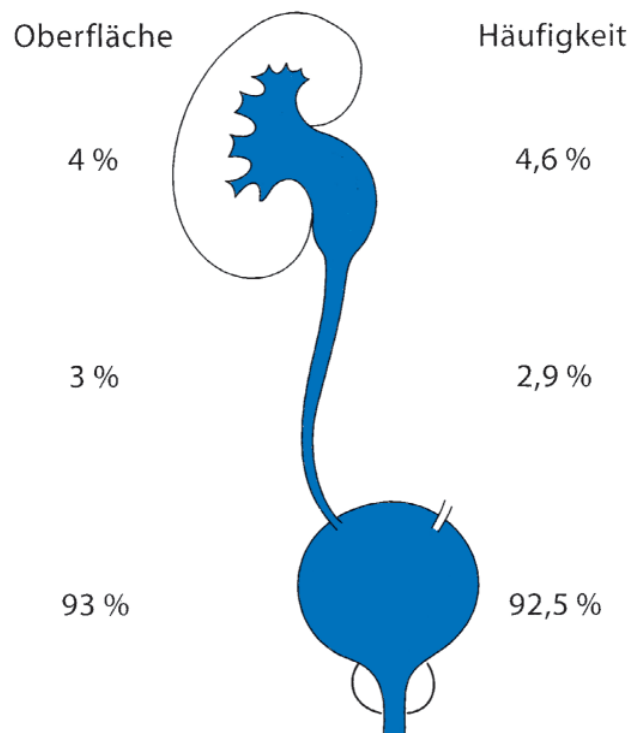


Abbildung 1-3: Der Vergleich zwischen den Oberflächenanteilen des Urothels und der Inzidenzrate von Urothelkarzinomen zeigt eine gute Übereinstimmung (aus Rübben und Otto, 1997).

### 1.2.4 Morphologie

Im Folgenden werden die verschieden morphologischen Formen des Urothelkarzinoms beschrieben. Die Karzinome gehen aus dem Übergangsepithel hervor und werden daher auch als Transitionalzellkarzinome (TCC) bezeichnet. Nach der WHO-Konsensus-Klassifikation soll jedoch der Begriff Urothelkarzinom bevorzugt werden (Epstein et al 1998).

Grundlegend kann man bei der Entstehung zwischen präkanzerösen Veränderungen des Urothels (Präneoplasien), als Vorläuferform und echten Neoplasien unterscheiden. Die Neoplasien können wiederum in verschiedene Tumorformen unterteilt werden.

#### 1.2.4.1 Präneoplasien

- Hyperplasie

Im Vergleich zum normalen Urothel (Abbildung 1-4), welches aus 4-5 Zellschichten besteht, findet man bei der Hyperplasie mehr als 5 Zellschichten, wobei jedoch die Epithelreihung noch regelrecht ist (Abbildung 1-5). Die Zellen haben ein basalzellähnliches Aussehen mit größeren und stärker anfärbbaren Kernen. Es sind jedoch noch keine Schichtungsstörungen zu erkennen (Held 1993).

- Dysplasie

Während bei der Hyperplasie nur eine Verdickung des Urothels zu erkennen ist, treten bei der Dysplasie (Abbildung 1-6) Zell- und Kernatypien auf. Hierbei sind vergrößerte Zellkerne, eine zugunsten des Nukleus veränderte Kern-/Plasma-Relation und veränderte Zellformen vorzufinden. Hierbei fällt auf, dass die Zellschichtung umso gestörter ist, je größer schwerer die Veränderungen sind (Bracken und Mackay 1991).

Früher wurde die Dysplasie je nach Ausmaß in eine milde, mittelgradige oder schwere Form unterteilt. Nach der neuen WHO-Klassifikation (Mostofi et al 1999) werden jetzt nur noch urotheliale Dysplasien und Carcinoma in situ unterschieden.

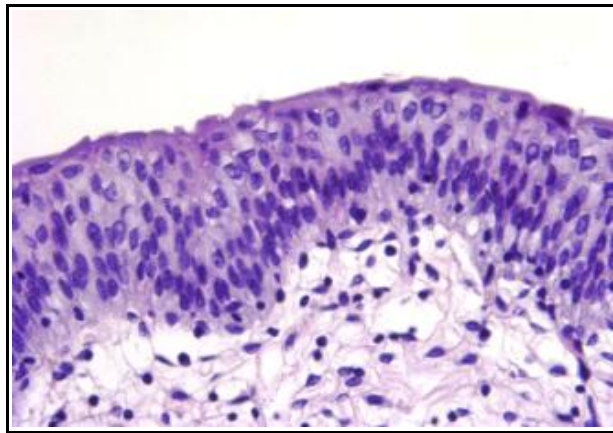


Abbildung 1-4: Normalurothel, Hämatoxilin/Eosin-Färbung, x400

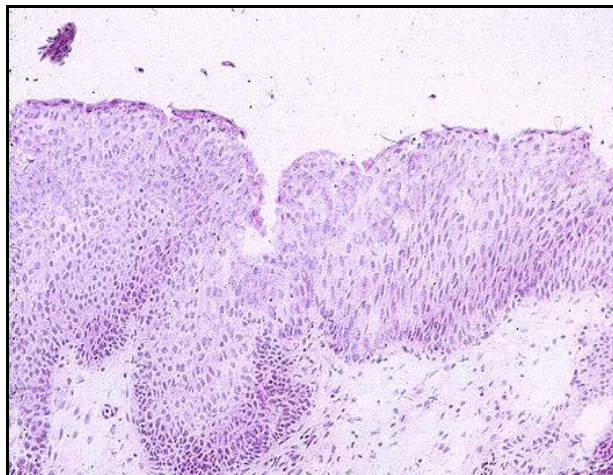


Abbildung 1-5: Urotheliale Hyperplasie, x200

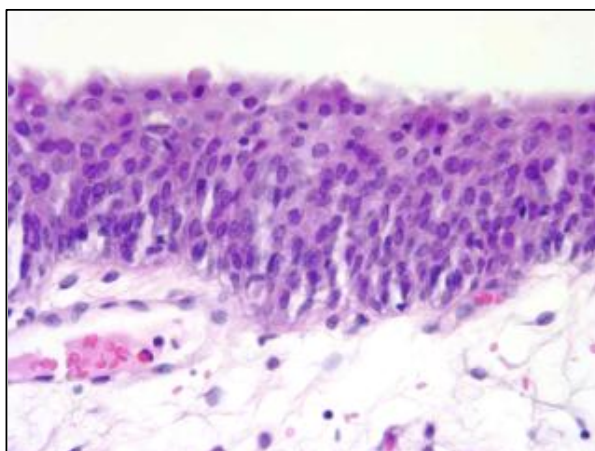


Abbildung 1-6: Urotheliale Dysplasie, x400

### 1.2.4.2 Neoplasien

Prinzipiell kann man beim Harnblasenkarzinom zwischen zwei verschiedenen Wachstumstypen unterscheiden. Zum einen das papilläre (exophytische) Karzinom, zum anderen das invasive solide Karzinom. Oft treten sie zur selben Zeit an mehreren Stellen der Blase auf. Aus dem nicht-invasiven papillären Tumor kann sich auch ein invasives Karzinom entwickeln (Böcker 2004).

- Papilläre Tumoren

Bei 60-80% aller Harnblasenkarzinome handelt es sich um papilläre Tumoren (Kunze et al 1992). Der Tumor wächst meist an der Seiten- bzw. Hinterwand der Blase, wobei auch ein multifokales Auftreten möglich ist. Zwei Drittel aller papillären Tumoren treten jedoch einzeln auf. Klinisch ist dies von Bedeutung, da Patienten mit multiplen Tumoren zugleich ein höheres Rezidivrisiko haben und multiple Tumoren ein aggressiveres Wachstum zeigen. Im Vergleich zum invasiven Urothelkarzinom sind die papillären Tumoren jedoch als weniger maligne einzuschätzen.

Charakteristisch für diese Tumorentität ist das exophytische Wachstum, mit fingerförmigen Ausläufern, welche ins Blasenlumen hineinragen, bzw. dieses auch komplett ausfüllen können. Die fingerförmigen Ausstülpungen enthalten ein fibrovaskuläres Stroma, welches auf beiden Seiten mit Urothel bedeckt ist (Abbildung 1-8). Das Urothel kann dabei sowohl ein nahezu normales bis anaplastisches Aussehen haben (Grignon et al 1997). Aus einem oberflächlichen papillären Tumor kann sich jedoch mit Zeit mit zunehmender Aggressivität ein invasiv wachsender Tumor, mit höherer Malignität, entwickeln.

- Carcinoma in situ (Cis)

Als Carcinoma in situ wird ein oberflächlich, nicht exophytisch wachsender Tumor bezeichnet, welcher noch keine Invasivität zeigt. Durch sein hohes malignes Potential und die schnelle Progression entwickelt sich jedoch in circa 70% mit zunehmender Aggressivität ein invasives Karzinom. Oft finden sich in der Harnblase synchron neben dem Cis noch weitere Tumoren. Hierbei entspricht die Häufigkeit eines Cis, dem fortgeschrittenen Ausbreitungs- und Malignitätsgrad der Begleittumoren.

Histopathologisch zeigt sich beim Cis eine komplett aufgehobene Zellschichtung mit Kernaplasien, die identisch sind mit High-Grade Urothelkarzinomen. Die Anzahl der Zellschichten ist dabei unwichtig, sie kann sowohl normal, als auch erhöht oder



vermindert sein. Die Zellkerne sind häufig pleomorph, hyperchromatisch und können große, irregulär geformte, Nucleoli haben. Auch Mitosen fallen gehäuft auf, ebenso wie mehrkernige Zellen. Der Verlust der interzellulären Kohäsion kann zu dem Erscheinungsbild eines „denuding CIS“ führen, da nur noch wenige Tumorzellen an der Oberfläche bleiben. Im Gegensatz zum invasiven Urothelkarzinom wird die Lamina propria beim Cis noch nicht infiltriert, sie zeigt aber bereits ein inflammatorisches Infiltrat, sowie eine Vermehrung der Kapillaren und Gefäßektasien (Grignon et al 1997).

- Nicht papilläres, solides, invasives Urothelkarzinom

Histologisch betrachtet ist das invasive Urothelkarzinom sehr variabel. Die meisten dieser Tumoren werden als high-grade eingestuft. Man findet kohäsive Zellnester mit mäßig bis stark amphophilem Zytoplasma und großen hyperchromatischen Kernen. In größeren Nestern kann man am Rand pallisadenförmig angeordnete Kerne finden. Bei den Nukleoli fällt auf, dass sie oft pleomorph sind und eine eckige Kontur besitzen. In ihrer Anzahl und in ihrem Erscheinungsbild sind die Nukleoli sehr variabel, wobei manche Zellen nur einzelne oder mehrere kleine, andere Zellen dagegen große eosinophile Nukleoli enthalten. Ein weiteres Charakteristikum sind die vermehrten Mitosefiguren, welche zum Teil auch abnormale Formen aufzeigen (Grignon et al 1997). Die invasiven Tumorzellnester induzieren oft eine desmoplastische Stromareaktion, welche mitunter stark ausgeprägt ist und einen malignen Spindelzell-Typ imitieren kann, bekannt auch als pseudosarkomatöse Stromareaktion (Lopez-Beltran et al 1998).

Meistens enthält das Stroma ein lymphozytäres Infiltrat mit einer unterschiedlichen Zahl an Plasmazellen. Die neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sind selten prominent. Um die Tumorzellnester findet man oft Retraktionsspalten, welche fälschlicherweise wie eine Gefäßinvasion erscheinen können (Grignon et al 1997).

Invasive Urothelkarzinome haben die Neigung in vielfältigster Weise zu differenzieren, wobei der squamöse Typ der häufigste ist, gefolgt von der glandulären Differenzierung. Sobald kleinzellige Differenzierungen zu finden sind, sollte immer, auch bei fokalen Veränderungen, die Diagnose eines kleinzelligen Karzinoms gestellt werden. Dies ist wichtig für die Therapie, da solche Läsionen eine schlechte Prognose haben (Eble et al 2004). In der untenstehenden Tabelle sind die verschiedenen Differenzierungstypen laut WHO-Klassifikation aufgelistet.

<b>Infiltrating urothelial carcinoma</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- with squamous differentiation</li><li>- with glandular differentiation</li><li>- with trophoblastic differentiation</li><li>- Nested</li><li>- Microcystic</li><li>- Lymphoepithelioma-like</li><li>- Lymphoma-like</li><li>- Plasmocytoid</li><li>- Sarcomatoid</li><li>- Giant cell</li><li>- Undifferentiated</li></ul>

Tabelle 1-2: verschiedene Differenzierungsformen  
des infiltr. Urothelkarzinoms, WHO 2004

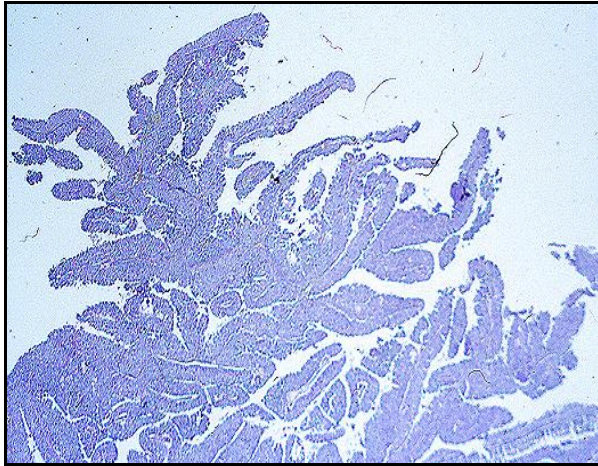


Abbildung 1-7: Papilläres  
Harnblasenkarzinom, Übersicht, x200

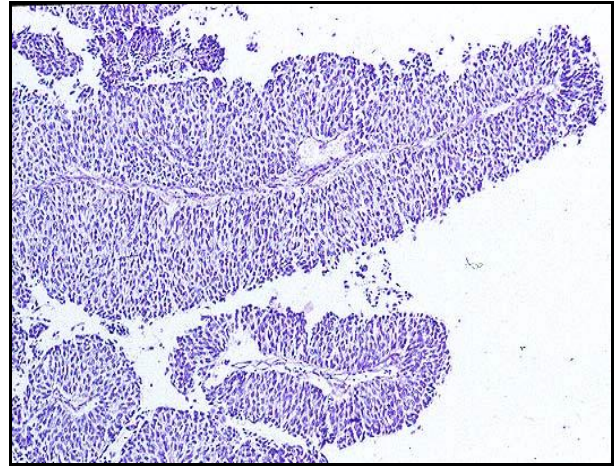


Abbildung 1-8: Papillärer Urotheltumor, x200

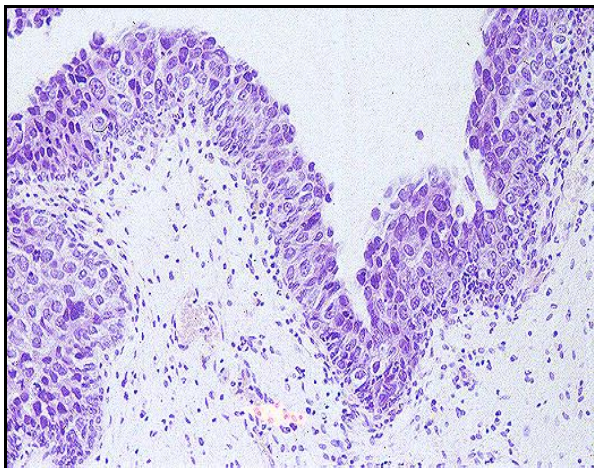


Abbildung 1-9: Carcinoma in situ, x200

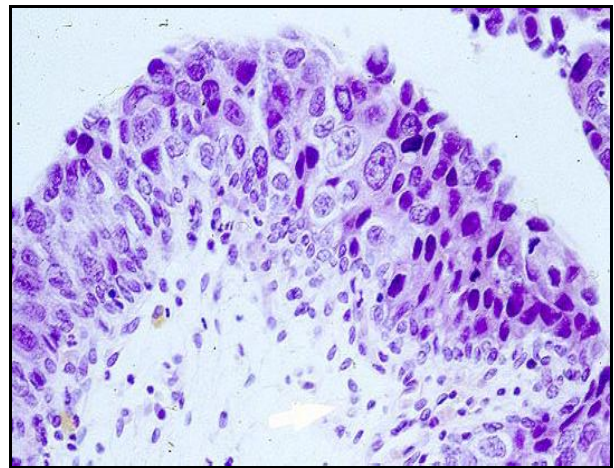


Abbildung 1-10: Carcinoma in situ, x400

### 1.2.5 TNM-Klassifikation und Grading

#### TNM-Klassifikation

Die TNM-Klassifikation ist ein Klassifikationssystem der Union Internationale contre le Cancer (UICC), welches die Ausbreitung des Tumors auf den Gesamtorganismus beschreibt. Hierbei beschreibt T (Tumor), die Infiltrationstiefe des Primärtumors in die Harnblasenwand. Danach folgt in der N-Klassifizierung die Beschreibung der Lymphknotenmetastasen und mit der M-Klassifizierung die Beschreibung eventuell vorhandener Fernmetastasen (siehe Abbildung 1-11 und Tabelle 1-3).

Das histologische Tumorstaging durch die TNM-Klassifikation ist wichtig für die weitere Therapieplanung und stellt einen wichtigen Prognosefaktor für eventuelle Tumorrezidive, Metastasierungsneigung und Überlebenswahrscheinlichkeit dar.

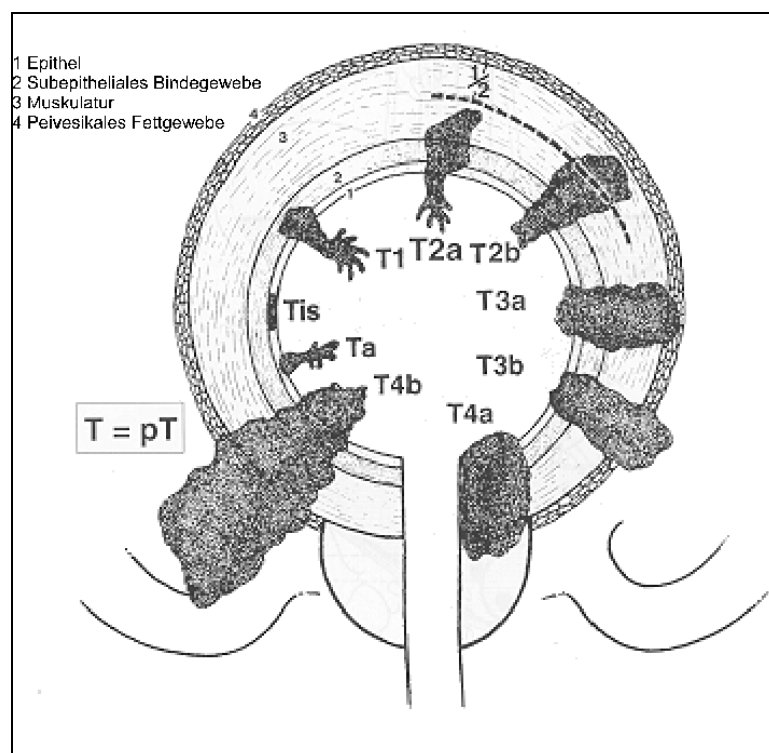


Abbildung 1-11: T-Stadien des Harnblasenkarzinoms mit schematischer Darstellung der Invasionstiefe in die Blasenwand (Hermanek et al 1997)

<b>T - Primärtumor</b>	
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Tumor
pTa	Nichtinvasives papilläres Karzinom
Tis	Carcinoma in situ "flacher Tumor"
Nx	Regionale Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Kein Anhalt für Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in einem einzigen Lymphknoten < 2cm
N2	Metastasen in einem Lymphknoten > 2cm und < 5cm oder mehrere Lymphknoten < 5cm
N3	Metastasen in einem Lymphknoten oder mehreren > 5cm
<b>M - Fernmetastasen</b>	
Mx	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 1-3: TNM-Klassifikation 2002 - Harnblasenkarzinom

### Grading

Ergänzend zur TNM-Klassifikation gehört zu einer genauen Tumorbeschreibung noch das Grading. Es dient dazu den Tumor einem bestimmten Malignitätsgrad zuzuordnen. Die Malignität wird durch die Morphologie und Differenzierung der Tumorzellen bestimmt, wobei diese mit zunehmender Entdifferenzierung steigt.

Während man bisher die Tumorzelldifferenzierung in Grad 1-3 eingeteilt hat, gilt mittlerweile seit 2004 die neue Klassifikation der WHO (Eble et al 2004). Man hat das Grading auf zwei Differenzierungsformen „Low grade“ und „High grade“ begrenzt, die Zwischenform G2 wurde gestrichen (Tabelle 1-4). Bei Low-grade-Tumoren zeigt sich ein geordnetes Erscheinungsbild mit nur geringen Veränderungen in der Zellschichtung und der Zellformen. Die High-grade-Tumoren dagegen zeigen erhebliche Schichtungsstörungen des Urothels, vermehrte Mitosen, vergrößerte Nukleolen und deutliche zytologische Veränderungen (Stoeckert et al 2007).

Als weitere Neuerung wurde neben Low- und High-grade-Karzinomen die papilläre-urotheliale-Neoplasie von niedrig malignem Potential (PUNLMP) eingeführt. Als PUNLMP werden Läsionen bezeichnet, die zwar keine malignen zytologischen Eigenschaften

aufweisen, aber normale urotheliale Zellen in einer papillären Formation bieten. Obwohl sie ein vernachlässigbares Progressionsrisiko haben, werden sie nicht als komplett benigne eingestuft und können rezidivieren (Karl et al 2008).

WHO-Grading 1973	WHO-Grading 2004
Urotheliales Papillom	Urotheliales Papillom
Grad 1: gut differenziert	Papilläre urotheliale Neoplasie niedrig malignen Potentials (PUNLMP)
Grad 2: mäßig differenziert	Low-grade papilläres urotheliales Karzinom
Grad 3: undifferenziert	High-grade papilläres urotheliales Karzinom

Tabelle 1-4: WHO-Grading im Jahr 1973 und im Jahr 2004

### 1.3 Molekulargenetik

Durch den Nachweis von somatischen Mutationen in einer Vielzahl von wachstumsregulierenden Genen in den meisten Tumorentitäten, sowie durch die Erforschung der molekularen Ursachen einiger familiärer Krebs syndrome, wird Krebs heute im Allgemeinen als genetische Erkrankung mit einer Akkumulation von somatischen Mutationen verstanden. Dabei entwickelt sich ein maligne transformierter Zellklon durch verschiedene genetische Alterationen in mehreren Stufen zum manifesten invasiven Tumor. Mittlerweile geht man auch beim Harnblasenkarzinom von einem solchen Mehrstufenprozess aus, in welchem eine Akkumulation verschiedener genetischer Veränderungen stattfindet (Bender und Jones 1998).

Bei der Kanzerogenese lassen sich zwei unterschiedliche Wege unterscheiden. Zum einen kommt es zu einer Amplifikation und/oder Überexpression von sogenannten Onkogenen, welche für Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktorrezeptoren, signalübertragende Moleküle und Transkriptionsfaktoren kodieren. Durch die übermäßige Aktivierung dieser Onkogene kommt es zu einer Stimulation des Zellzyklus, die Proliferationsrate der Zellen erhöht sich und ein unkontrolliertes Wachstum findet statt.

Im Gegensatz dazu regulieren Tumor-Suppressor-Gene (TSG) durch inhibitorische Kontrolle den Zellzyklus und somit Wachstum und Lebensdauer einer Zelle. Durch den hemmenden Effekt wird eine übermäßige Zellteilung verhindert.

Ausgehend von der Beobachtung, dass im Tumorgewebe beide Allele defekt waren, postulierte Knudson 1985 seine „Two-Hit-Hypothese“ bezüglich des Funktionsverlustes von TSG. Während sich Onkogene dominant verhalten (d.h. ein betroffenes Allel reicht bereits für den Effekt auf den Zellzyklus aus), zeigen TSG rezessive Eigenschaften, was bedeutet, dass beide Allele des Gens defekt sein müssen um ein Tumorstadium auszulösen.

Wie man heute weiß, kommt es zuerst in einem der Allele zu einer Punktmutation (Substitution, Deletion oder Insertion). Bei der Inaktivierung des zweiten Allels kommt es zu einem Verlust von größeren Chromosomenabschnitten. Als Ursache kommen eine Fehlverteilung (mitotische Nondisjunction) oder andere Mechanismen (z.B. mitotische Rekombination mit Genkonversion bei heterozygoten Genloci) in Frage.

TSG haben auch eine Funktion im Erkennen und Reparieren von DNA-Schäden und Replikationsfehlern. Fällt diese Reparaturfunktion aus, so können genetische Schäden somit

in der Zelle akkumulieren, was mit einer Progression der Tumorerkrankung verbunden sein kann (Stratton MR 1996).

### 1.3.1 Tumorsuppressorgene

Neben der Aktivierung von Onkogenen spielt auch die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen eine wichtige Rolle in der Kanzerogenese.

Eine charakteristische Eigenschaft von Tumorzellen ist die ungehemmte Proliferation. An der Kontrolle der Proliferation ist eine Reihe von Faktoren beteiligt. Dazu gehören extrinsische, z.B. diffundierende Wachstumsinhibitoren und Signale von anliegenden Zellen (Zell-Zell-Kontakte), sowie intrinsische Faktoren. Diese Signale müssen entlang einer Signalkette zum Zellkern übertragen werden, wo die Replikationskontrolle stattfindet. In vielen dieser Kaskaden sind Onkogene als positive, Tumorsuppressorproteine dagegen als negative Regulatoren („gatekeeper“) zu finden. Zu den Tumorsuppressorproteinen gehören entsprechende Zelladhäsionsmoleküle, Signaltransduktionsproteine und solche, die im Zellkern Transkription und Replikation kontrollieren. Eine zweite große Gruppe umfasst Tumorsuppressorgene („caretaker“), die an der DNA-Reparatur beteiligt sind oder „Checkpoints“ und Apoptose nach Schädigungen des Genoms auslösen (Rübben, Kinzler und Vogelstein 1997).

**P53:** Das p53-Gen ist wohl das bekannteste und am meisten erforschte Tumorsuppressorgen. Im menschlichen Genom liegt es auf Chromosom 17p13 und besteht aus elf Exons, mit einer Größe von circa 20 kb. Die Hauptaufgabe dieses Gens besteht in der Regulation des Zellzyklus, es ist zudem beteiligt an der Transkription, an der DNA-Reparatur, der Wahrung der genomischen Stabilität, der Zellalterung, sowie an der Apoptose (Harris 1996). Bei einer durch Mutation verursachten Schädigung dieser Kontrollfunktionen, kann es zum Tumorwachstum kommen. Die Beteiligung von p53-Mutationen beim Urothelkarzinom, vor allem bei invasiven Formen, sowie Dysplasien und CIS, konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden (Bender und Jones 1998).

Kommt es zu einer vermehrten Schädigung der DNA einer Zelle, so wird durch p53 der Zellzyklus in der G1-Phase angehalten, so dass eine Reparatur der geschädigten DNA-Abschnitte erfolgen kann, woran p53 ebenfalls beteiligt sein soll (Harris 1996). Der Arrest in der G1-Phase erfolgt durch eine Bindung von p53 an das WAF1-Gen, wodurch die Transkription von p21 gestartet wird. Dieses Protein inaktiviert cyclinabhängige Kinasen, welche somit nicht mehr in der Lage sind, das Retinoblastom-Protein durch Phosphorylierung



zu inaktivieren. Das Retinoblastom-Protein verhindert das Voranschreiten der Zelle in die S-Phase. Daneben kann p53 auch direkt an den Promotor des Retinoblastom-Gens binden und dessen Transkription fördern (siehe Abbildung 1-12).

Für den Funktionsverlust von p53 werden vor allem Deletionen und Mutationen verantwortlich gemacht. Nach dem Chromosom 9 stehen hierbei 17p-Deletionen an zweiter Stelle.

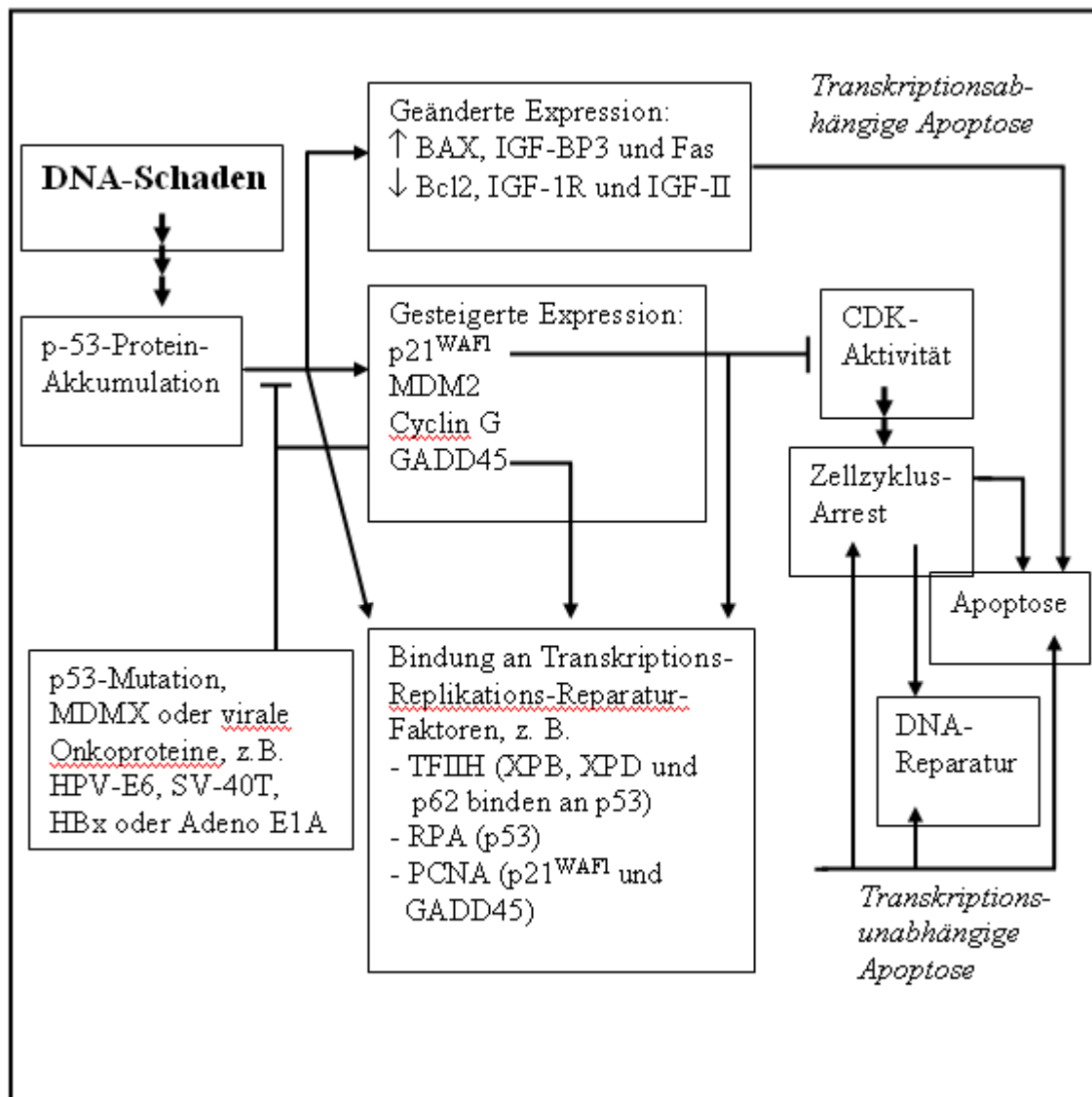


Abbildung 1-12: Funktion von p53 beim Auftreten eines DNA-Schadens in Bezug auf Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur und Apoptose;

GADD = Growth Arrest and DNA Damage Factor, PCNA = Proliferating Cell Nuclear Antigen, RPA = Replicating Protein Antigen, XPD = Xeroderma pigmentosum Group D DNA Helicase, XPB = Xeroderma pigmentosum Group B DNA Helicase, TFIIH = Transcription Factor Complex IIH, MDMX = X Homologue of Murine Double Minute Gene, MDM2 = Multiple Double Minute Protein, HPV-E6 = Human Papillomavirus Protein E6, SV-40T = Simian Virus-40 Large T Antigen, HBx = Hepatitis B Viral X Protein, Adeno E1A = Adenovirus Protein E1A; (nach Harris, 1996).

### 1.3.2 Onkogene

Neben der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen spielt auch die Aktivierung von Onkogenen eine wichtige Rolle in der Kanzerogenese.

Die sogenannten Protoonkogene wirken physiologisch positiv regulierend auf Wachstum, Proliferation und Differenzierung. Sie können für eine Reihe verschiedener Proteine z.B. Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktorrezeptoren, Signaltransduktoren (G-Proteine), Proteinkinasen oder Transkriptionsfaktoren kodieren. Somatische Mutationen der Protoonkogene führen zu ihrer Aktivierung zum Onkogen und zur unkontrollierten Proliferation. Die Mutationen können Proteine mit veränderten Eigenschaften erzeugen oder zur Überproduktion eines unveränderten Onkoproteins führen. Aktivierungen bestimmter Onkogene sind für manche Tumorentitäten charakteristisch und korrelieren mit dem klinischen Verlauf (Rübben 1997).

In genetischen Studien konnte festgestellt werden, dass auch beim Harnblasenkarzinom mehrere bereits bekannte Onkogene mutiert sind und für die urothelialen Veränderungen verantwortlich gemacht werden können (Knowles et al 2001).

Hierbei bilden *ras*, *erbB-2* und der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) die wichtigsten Onkogene im Harnblasenkarzinom. Das kanzerogene Potential wird im Falle von *ras* durch Mutationen verursacht, EGFR und *erbB-2* werden in genetisch veränderten Zellen amplifiziert und überexprimiert.

Das Onkogen H-*ras*, welches auf dem Chromosom 11p15 lokalisiert ist, ist in 5-16% aller Blasenkarzinome mutiert, es gibt jedoch auch Studien in welchen in 30-45% eine Mutation festgestellt werden konnte. Das Guanylatcyclase-gekoppelte-Signaltransduktionsprotein ist hierbei durch eine Mutation ständig aktiviert. Es hat seine Eigenschaft verloren GTP zu hydrolysieren und somit zu inaktivieren, woraus ein anhaltendes Zellwachstum resultiert (Knowles 1995; Orntoft 1998).

Eine weitere wichtige Gruppe der Onkogene bilden *erbB-2* und EGFR, welche zur Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren gehören. Diese Rezeptoren werden bei Aktivierung von inaktiven Monomeren zu aktiven Dimeren umgewandelt. Dies führt zu einer Konformationsänderung und Autophosphorylierung des Rezeptors, welcher für die Regulierung der Zellproliferation verantwortlich ist. Die Bindung von EGFR führt in den malignen Zellen zu einer starken Zellproliferation und zu starkem Zellwachstum (Toncheva et al 2003). *ErbB-2* ist auf dem Chromosomenabschnitt 17q lokalisiert, welcher in 10-14% aller Tumoren mutiert ist und mit einer schlechten Differenzierung und einer ausgedehnten

Tumorausbreitung einhergeht (Mian et al 2003). Es konnte beobachtet werden, dass eine erhöhte EGFR-Expression häufiger bei wenig differenzierten, hochgradigen Tumoren zu finden ist als bei hochdifferenzierten, niedriggradigen Tumoren. Eine Amplifikation des erbB2-Onkogens findet man bevorzugt bei höhergradigen, fortgeschrittenen Tumoren (Kroft 1994; Orntoft 1998; Knowles 1998).

Im Rahmen vergleichender genomischer Untersuchungen konnten eine ganze Reihe von amplifizierten Genen entdeckt werden, welche möglicherweise Träger weiterer Onkogene sind. Dennoch scheinen die Onkogene beim Urothelkarzinom keine überragende Rolle zu spielen (Bender und Jones 1998). Eine Ausnahme bilden hierbei jedoch die im Folgenden beschriebenen FGFR3- und PIK3CA-Mutationen.

### **1.3.3 FGFR3 Mutationen**

Fibroblast growth factors gehören zu einer Familie multifunktioneller Wachstumsfaktoren und sind an einer Vielzahl von zellulären Vorgängen wie Proliferation, Differenzierung, Angiogenese oder Wundheilung beteiligt (Keegan et al 1991). Sie binden an spezifische Rezeptoren (FGFR), wodurch ein Signal ins Zellinnere übertragen wird. Das FGFR3 Gen ist auf Chromosom 4p16.3 lokalisiert. Eine Mutation führt zu einer ständigen Aktivierung des Rezeptors, unabhängig von einer Ligandenbindung. Die klinischen Folgen sind ein verfrühtes Schließen der Wachstumsfugen der Röhrenknochen und damit ein vermindertes Längenwachstum der Extremitäten, was bis zu letalen Skelettveränderungen führen kann (Rousseau et al 1995). Im Bezug aufs Harnblasenkarzinom sind somatische FGFR3-Mutationen bei bis zu 35% aller Patienten zu finden, sie sind damit die häufigsten genetischen Mutationen überhaupt in Urothelkarzinomen (Cappellen et al 1999). In neueren Veröffentlichungen wird von einer noch höheren Rate, von circa 50-75% FGFR3-Mutationen beim primären Harnblasenkarzinom berichtet (van Oers et al 2005 u. 2007). Die Arbeitsgruppe um van Rhijn fand 2001 in ihren Studien einen Zusammenhang zwischen FGFR3 Mutationen und einem verminderten Rezidivrisiko beim Harnblasenkarzinom. Auch van Oers et al stellten 2005 fest, dass FGFR3-Mutationen mit einer höheren Überlebenswahrscheinlichkeit bei invasiven Blasentumoren einhergehen. Billerey et al (2001) konnten feststellen, dass diese genetische Alteration signifikant häufiger in oberflächlichen Urotheltumoren, jedoch nicht in fortgeschrittenen invasiven Tumoren oder flachen Neoplasien zu finden ist. Man konnte zudem herausfinden, dass die FGFR3 Mutationen sehr

spezifisch für Urotheltumoren sind und in anderen Tumortypen nur sehr selten auftreten (Karoui et al 2001; Sibley et al 2001).

Die aktivierenden somatischen Mutationen des FGFR3 Gens stellen somit ein potentielles, initiales Ereignis in der Entwicklung des oberflächlichen papillären Harnblasenkarzinoms dar. Dies ist wahrscheinlich mit einer besseren Prognose für den Patienten verbunden (Capellen et al 1999; Jebar et al 2005; van Oers et al 2005; Burger et al 2006).

#### 1.3.4 PIK3CA Mutationen

Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K, PI3-Kinasen) sind Enzyme, welche eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion spielen und eine Schlüsselfunktion in der Regulierung von Zellwachstum, Zellproliferation, Differenzierung und Überleben haben.

Durch Bindung von Wachstumsfaktoren an den transmembranären Tyrosinkinase-Rezeptor (RTK) wird zum einen der RAS/RAF/MEK/ERK Signalweg, zum anderen die PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade aktiviert. Beide Signalwege führen letztendlich zu einer Zellzyklusproliferation und zu einem Zellwachstum (Abbildung 1-13). Neuere Studien haben bei Blasen Tumoren genomische Veränderungen einzelner Komponenten auf dem PI3K/Akt Signalweg gefunden. Betroffen sein können: Die Protoonkogene PIK3CA (phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide) und AKT1 (Proteinkinase B) oder die Tumorsuppressorproteine PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) und TSC1. Im folgenden Abschnitt wird auf die PIK3CA-Mutationen beim Blasenkarzinom eingegangen.

Den Aufbau betreffend sind PI3-Kinasen Heterodimere, welche aus einem 85kDa schweren Adapterprotein (p85) und einer 110kDa schweren katalytischen Untereinheit (p110) zusammengesetzt sind. Von der p110-Untereinheit gibt es drei Isoformen (p110 $\alpha$ , p110  $\beta$  und p110 $\delta$ ), welche alle eine ähnliche Struktur besitzen. In Tumoren wurden hierbei meistens Mutationen/Amplifikationen der p110  $\alpha$  Untereinheit (PIK3CA) nachgewiesen (Knowles MA et al 2009).

Im Urothelkarzinom wurden somatische PIK3CA-Mutationen in 13-27% der Fälle gefunden, hierbei traten diese auch oft in Kombination mit FGFR3-Mutationen auf (López-Knowles et al 2006; Platt et al 2009). Platt et al konnten ebenfalls nachweisen, dass solche Veränderungen vor allem mit oberflächlichen „low grade“ Karzinomen assoziiert sind. Die Verteilung der PIK3CA-Mutationen lag in dieser Studie bei 35% bei Ta-, 39% bei T1- und 25% bei T2-Tumoren.

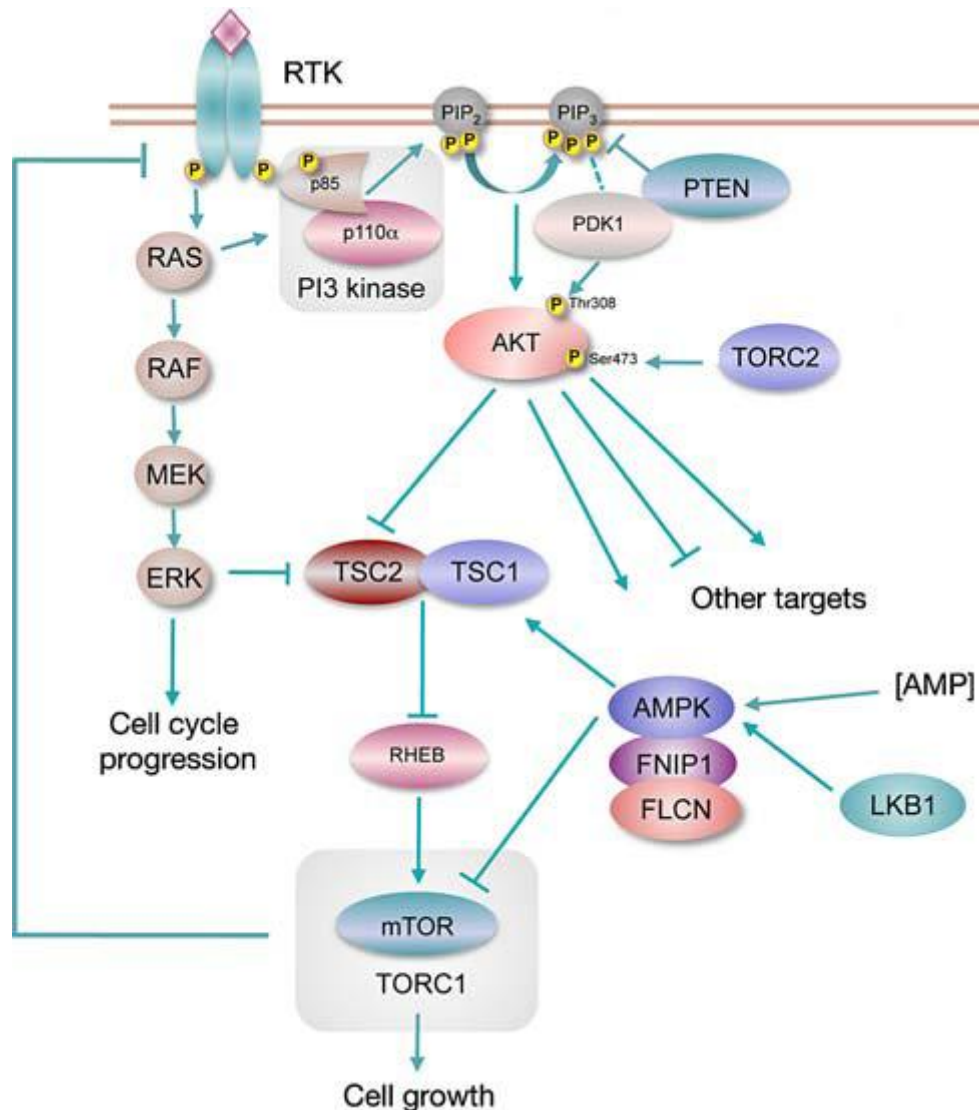


Abbildung 1-13 PI3K/AKT/mTOR-Signalfad (Knowles MA et al 2009)

### 1.3.5 Chromosom 9 und 17

Beim Harnblasenkarzinom treten genetische Veränderungen am häufigsten im Bereich des Chromosoms 9 auf. So konnten Bender und Jones 1998 im Rahmen einer Metaanalyse von 580 Blasenkarzinomen in mehr als der Hälfte der Fälle Deletionen auf Chromosom 9 ermitteln. Hierbei ist der lange 9q-Arm häufiger von Deletionen betroffen als der kurze p-Arm (vgl. Abbildung 1-14).

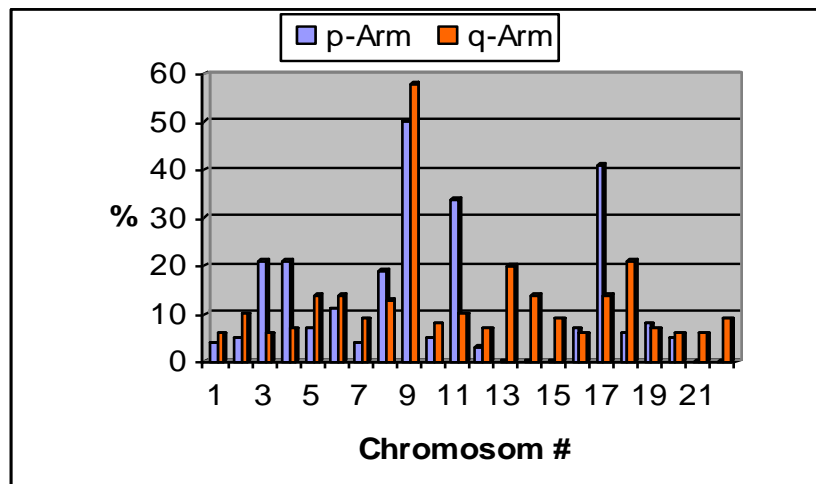


Abbildung 1-14 Prozentuale Häufigkeit chromosomaler Deletionen beim Blasenkarzinom (nach Bender und Jones, 1998)

Die Chromosom 9-Monosomierate liegt beim Harnblasenkarzinom bei circa 40% (Ruppert et al 1993; Keen und Knowles 1994). Dabei ist die Reihenfolge, ob zuerst ein 9q oder ein 9p Verlust stattfindet, bislang noch unbekannt (Reznikoff et al 1996). Man vermutet jedoch, dass eine 9q Deletion der dysplastischen Veränderung von Normalurothel vorangeht, da diese die häufigste und oft einzig nachweisbare genetische Veränderung bei papillären nichtinvasiven Tumoren darstellt (Czerniak et al 1999; Simoneau et al 1999). Es gibt jedoch auch Karzinome welche, bei noch unverändertem 9q, eine Deletion von 9p aufweisen (Miyao et al 1993; Ruppert et al 1993; Gonzalez-Zulueta et al 1995; Hartmann et al 2000). Bei partiellen und kompletten Deletionen von Chromosom 9 handelt es sich offenbar um ein frühes und häufiges Ereignis der urothelialen Karzinogenese. Hierbei treten die Allelverluste auf Chromosom 9 unabhängig von Grad und Stadium des Tumors auf. In erster Linie findet man jedoch Chromosom 9-Verluste in Verbindung mit gut differenzierten, oberflächlich-papillären Tumoren; diese zeigen zwar eine erhöhte Rezidivwahrscheinlichkeit, durch ihre langsamere Progression und eine spätere Infiltrationstendenz wird dieser Tumorentität jedoch ein niedrigeres Malignitätspotential zugeschrieben (Dalbagni et al 1993; Keen und Knowles, 1994; Sauter et al 1995).

In der Zwischenzeit wurden auf 9p und 9q mehrere Regionen identifiziert, in welchen beim Harnblasenkarzinom besonders häufig Mutationen bzw. Allelverluste gefunden werden konnten und welche somit mutmaßliche Tumorsuppressorgenloci darstellen.

Am zweithäufigsten sind genetischen Veränderungen beim Blasenkarzinom auf Chromosom 17 zu finden. Hierbei dominieren 17p Deletionen und Mutationen des p53-Tumorsuppressorgens, welches auf 17p13.1 lokalisiert ist. Solche Veränderungen sind vor allem beim Carcinoma in situ und beim fortgeschrittenen invasiven Harnblasenkarzinom (T2-T4) zu erkennen (Dalbagni et al 1993; Spruck et al 1994; Miyamoto et al 1996). Hyperplasien und oberflächlich-papilläre Tumoren weisen dagegen nur selten Deletionen des p53-Gens auf (Hartmann et al 1999).

### **1.3.6 Modell der Pathogenese des Urothelkarzinoms**

Beim Harnblasenkarzinom kann man grundsätzlich zwischen zwei verschiedenen Formen unterscheiden. Zum einen die papillären Tumoren, welche ein geringes malignes Potential aufweisen, zum anderen das Carcinoma in situ, welches sich meist rapide zu einem soliden, invasiven Tumor mit malignem Potential entwickelt. Auch auf molekularer Ebene zeigen diese beiden Tumoren zwei verschieden Entstehungswege (Spruck et al 1994; vgl. Abbildung 1-15).

Dabei führen p53-Mutationen zum schlecht differenzierten, invasiven Urothelkarzinom, welches tendenziell eine ungünstige Prognose hat. Dagegen zeigen sich auf der Seite der papillären Tumoren vermehrt aktivierende Punktmutationen im FGFR3-Gen. Im Cis und invasiven Karzinom sind diese Mutationen nur sehr selten aufzufinden. Somit lässt sich auch sagen, dass Patienten mit einer FGFR3-Mutation im Tumor eine signifikant bessere Prognose haben als die andere Gruppe. Finden sich Karzinome mit Alterationen in beiden Genen, so entstehen diese vermutlich aus der FGFR3-Gruppe.

Man kann also sagen, dass das Auftreten und der Zeitpunkt von Deletionen verschiedener Regionen des Chromosoms 9, von aktivierenden Mutationen des Wachstumsfaktors FGFR3 und von Mutationen des p53-Gens entscheidend ist für den Entstehungsweg des Urothelkarzinoms und somit auch für die weitere Prognose.



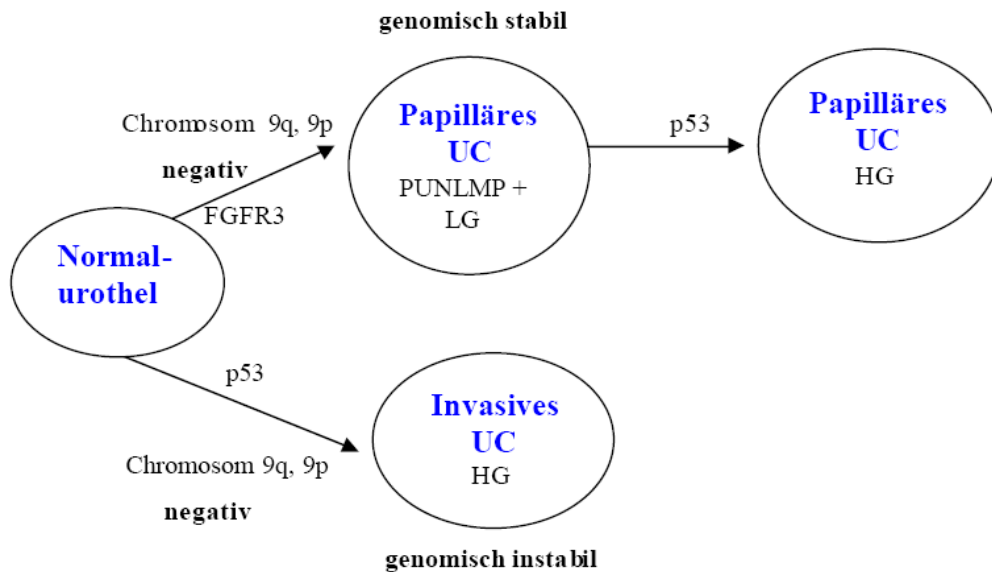


Abbildung 1-15: Modell der Pathogenese des Urothelkarzinoms. PUNLMP = Papillary Urothelial Neoplasm of Low Malignant Potential, LG = Low Grade, HG = High Grade.

### 1.3.7 Klonalität multifokaler Harnblasenkarzinome

Klinisch wichtige Charakteristika von Urothelkarzinomen sind das häufig multifokale Auftreten und eine hohe Rezidivneigung, was bedeutet, dass neben der Harnblase auch im Nierenbecken und in den Ureteren synchrone oder metachrone Tumoren zu finden sind. Das umgebende Urothel solcher Tumore weist oft großflächige dysplastische Veränderungen auf (Knüchel R, Hofstädter F 2004).

Für das multifokale Auftreten beim Harnblasenkarzinom gibt es zwei unterschiedliche Entstehungstheorien, zum einen die Theorie der Feldkanzerisierung und gegensätzlich dazu, dass es sich um eine monoklonale Erkrankung handelt.

**Feldkanzerisierung:** Diese Hypothese besagt, dass die Urothelzellen an unterschiedlichen, Stellen unabhängig voneinander durch die Kanzerogenexposition zu malignen Zellen transformieren. Die verschiedenen Klone können sich dann synchron oder metachron an mehreren, zum Teil weitauseinanderliegenden Stellen zu Urothelkarzinomen entwickeln (Heney et al 1978; Harris und Neal 1992).

**Theorie der klonalen Expansion:** Nach dieser Theorie erfährt nur eine einzige urotheliale Zelle eine maligne Transformation. Dieser initiale Klon breitet sich via intraepithelialer Migration und intraluminale Streuung unkontrolliert aus, wodurch sich im gesamten Urothel multifokale oder rezidivierende Tumoren bilden können (Soloway et al 1989).

Untermuert wird diese monoklonale Entstehungstheorie unter anderem durch eine Studie von Sidransky und Mitarbeitern. Er konnte bei drei Frauen mit multiplen Harnblasenkarzinomen zeigen, dass die untersuchten Tumoren jeweils identische X-chromosomale Inaktivierungsmuster und identische Deletionen auf Chromosom 9 aufwiesen (Sidransky et al 1992).

Sowohl die Feldkanzerisierung mit Entstehung mehrerer unabhängiger Tumorklone als auch die klonale Ausbreitung eines Klons scheinen also für das multifokale Auftreten des Urothelkarzinoms verantwortlich zu sein. Die molekularen Daten sprechen dafür, dass die Ausbreitung des Tumorklons innerhalb des Urothels durch eine intraluminale Absiedlung von Tumorzellen erfolgen kann. Insbesondere das Entstehen von Harnblasenkarzinomen bei Patienten mit vorhergehender Diagnose eines Urothelkarzinoms des oberen Harntrakts ist nicht anders zu erklären (Hartmann et al 2002).

#### 1.4 Therapieoptionen beim fortgeschrittenen Harnblasenkarzinom

Das lokal fortgeschrittene, nicht metastasierende Harnblasenkarzinom kann mittels radikaler Zystektomie - gegebenenfalls in Kombination mit einer prä- oder postoperativen Chemo-, Radio- oder Radiochemotherapie - oder mit einer alleinigen Radio- oder kombinierten Radiochemotherapie erfolgen. Diese häufig multimodale Therapie hat das Ziel die lokale Tumorkontrolle zu verbessern und die Häufigkeit distanter hämatogener Metastasen zu reduzieren (Liedl B, Zimmermann F, 2005).

Da das gesamte Patientengut, welches für diese Arbeit ausgewählt wurde, eine adjuvante Chemotherapie erhalten hat, soll diese im Folgenden beschrieben werden. Dabei wird auf die beiden gängigen Methoden, das M-VAC- und das Cisplatin-Schema, näher eingegangen.

Die klinischen Ergebnisse von Patienten mit lokal fortgeschrittenem Harnblasenkarzinom, welche alleine eine radikale Zystektomie und Entfernung der pelvinen Lymphknoten, erhalten haben sind nicht zufriedenstellend. Dies ist in den westlichen Industrieländern zwar die Standardtherapie, jedoch entwickeln mindestens 40% aller Patienten mit einem T3-Tumor und 70% aller Patienten mit einem Lymphknotenbefall ein Tumorrezidiv innerhalb der ersten fünf Jahre (Lehmann J et al 2002). Ursache hierfür ist eine häufige hämatogene Metastasenbildung. Aus diesem Grund wird oft eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt, welche das Ziel hat, den Erfolg vorangegangener lokaler Maßnahmen zu konsolidieren und vorhandene nicht sichtbare Tumorresiduen zu erfassen. Dabei wird die frühere Standardtherapie nach dem M-VAC- bzw. M-VEC-Schema aufgrund ihrer höheren Nebenwirkungen immer mehr abgelöst durch eine Cisplatin-basierte Chemotherapie (Liedl B, Zimmermann F, 2005).

Der Nutzen der adjuvanten Chemotherapie konnte durch mehrere Studien konsolidiert werden:

Skinner et al haben 1991 eine Studie mit 91 Patienten durchgeführt. Hierbei wurde die Kontrollgruppe alleine durch eine Zystektomie behandelt, die andere Gruppe erhielt eine Zystektomie mit anschließender adjuvanter Chemotherapie mit Cyclophosphamid, Adriamycin und Cisplatin. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war das progressionsfreie Überleben durch die adjuvante Chemotherapie deutlich erhöht (34% vs. 51%). Die mittlere Überlebenszeit war mit 4,3 Jahren im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 2,4 Jahren ebenfalls erhöht (Skinner et al 1991).

Auch Stöckle und Mitarbeiter kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Sie konnten zeigen, dass das tumorfreie Überleben bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Harnblasenkarzinom (pT3b, pT4a) und/oder pelvinen Lymphknotenmetastasen durch eine adjuvante Chemotherapie nach dem M-VAC- oder M-VEC-Schema signifikant erhöht ist im Vergleich zu Patienten, die ausschließlich eine Zystektomie ohne Chemotherapie erhielten (Stöckle et al 1992).

#### **1.4.1 Adjuvante Chemotherapie nach dem MVAC-Schema**

Seit der Einführung in den 80er Jahren galt die Polychemotherapie nach dem MVAC-/MVEC-Schema lange Zeit als Goldstandard zur Behandlung beim metastasierenden Blasenkarzinom (MVAC: Methotrexat, Vinblastin, Adriblastin, Cisplatin; MVEC: Methotrexat, Vinblastin, Epirubicin, Cisplatin). Der Therapieplan hierbei sieht folgendermaßen aus:

- Methotrexat:  $30\text{mg}/\text{m}^2$  an Tag 1, 15, 22;
- Vinblastine:  $3\text{mg}/\text{m}^2$  an Tag 2, 15, 22;
- Epirubicin:  $45\text{mg}/\text{m}^2$  an Tag 2
- Cisplatin:  $70\text{mg}/\text{m}^2$  an Tag 2

Das Therapieschema wird dabei alle 28 Tage wiederholt bei maximal drei Zyklen.

Ein Nachteil jedoch ist die hohe Toxizität: Granulozytopenie 24%, Stomatitis 17%, granulozytopenisches Fieber 10%, Todesfälle bis zu 5% (Liedl B, Zimmermann F, 2005). Hierzu sei auch auf Kapitel 1.5 hingewiesen, in welchem die Studie von Lehmann und Mitarbeitern zur Behandlung des lokal fortgeschrittenen Blasenkarzinoms näher beschrieben wird und in welcher der Autor zeigen konnte, dass durch die MVAC-Therapie deutlich mehr Grad 3 und 4 Toxizitäten auftreten als durch eine Kombination von Cisplatin und Methotrexat. Auch andere Autoren bestätigen mit ihren Studien die hohe Toxizität der MVAC-Chemotherapie (Saxman et al 1997, Von der Maase et al 2000).

### 1.4.2 Adjuvante Chemotherapie nach dem Cisplatin-Schema

Im Gegensatz zu der oben beschriebenen MVAC-Kombination zeigen sich bei einer Therapie mit Cisplatin und Methotrexat deutlich weniger Nebenwirkungen bei gleicher Effektivität (Lehmann et al 2005, Von der Maase et al 2000). Der Behandlungsplan nach dem CM-Schema sieht folgendermaßen aus:

- Cisplatin:  $70\text{mg/m}^2$  an Tag 1
- Methotrexat:  $40\text{mg/m}^2$  an Tag 8 und 15

Das Therapieschema wird dabei alle 21 Tage wiederholt bei maximal drei Zyklen.

### 1.5 Studie der Arbeitsgemeinschaft für Urologische Onkologie AUO-AB 05/95

Da die klinischen Daten dieser Arbeit auf einer bereits abgeschlossenen großen Chemotherapiestudie der AUO unter Federführung von M. Stöckle und J. Lehmann beruhen, soll diese im Folgenden kurz zusammengefasst werden.

Die Studie „Adjuvant Cisplatin Plus Methotrexate Versus Methotrexate, Vinblastine, Epirubicin, and Cisplatin in Locally Advanced Bladder Cancer: Results of a Randomized, Multicenter, Phase III Trial (AUO-AB 05/95)“ (J Clin Oncol) wurde im August 2005 veröffentlicht. Hierbei wurden zwei verschiedene Patientengruppen bezüglich ihrer Überlebenswahrscheinlichkeit verglichen. Alle 327 Patienten waren an einem lokal fortgeschrittenem Harnblasenkarzinom (pT3a-4a) erkrankt und hatten eine radikale Zystektomie erhalten. Zudem wurden die Patienten durch eine adjuvante Chemotherapie behandelt, die bei der eine Gruppe durch das CM-Schema (Cisplatin, Methotrexate) und bei der anderen Gruppe durch das M-VEC-Schema (Methotrexate, Vinblastine, Epirubicin, Cisplatin) erfolgte.

Folgende Ergebnisse wurden aufgezeigt: Bezüglich der Toxizität der beiden Chemotherapien überwogen vor allem hämatologische Nebenwirkungen, hierbei besonders die Leukopenie. Diese trat bei der M-VEC Gruppe signifikant öfter auf als bei der CM Gruppe (22,2% v 7%). Tumorrezidive wurden bei 46% der Patienten in der CM Gruppe und bei 44,5% in der M-VEC Gruppe beobachtet. Auch bezüglich der 5-Jahres-Überlebensrate gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Sie liegt bei den mit CM therapierten Patienten bei 46,3% und bei den mit M-VEC behandelten Patienten bei 48,8%. In der Nachbeobachtungszeit starben 39,9% in der CM-Gruppe und 37,8% in der M-VEC Gruppe an dem Tumorleiden.

Zusammenfassend konnte diese Studie somit zeigen, dass eine adjuvante Therapie mit Cisplatin und Methotrexate die gleiche Effektivität aufweist wie die MVAC-Standardtherapie, welche eine sehr hohe Toxizität und Nebenwirkungsrate zeigt. Zudem entwickelten die Patienten, welche durch CM behandelt wurden, signifikant seltener eine Leukopenie (Grad 3 oder 4) als die mit M-VEC behandelten Patienten.

## 1.6 Prädiktive Faktoren fürs Überleben und Chemo-Ansprechen beim Harnblasenkarzinom

Therapieentscheidungen und Nachsorgepläne für Blasenkarzinompatienten richten sich hauptsächlich nach den klassischen histopathologischen Kriterien. Zwar bietet die konventionelle Histopathologie eine gute Risikoabschätzung in Bezug auf Rezidiv- und Prognoseverlauf des Harnblasenkarzinoms, jedoch ist das biologische Verhalten für jeden individuellen Blasentumor nur unzureichend charakterisiert. Im Idealfall braucht der Urologe ein einfaches, in der Klinik anwendbares Testverfahren, das neben der Histopathologie zusätzliche, unabhängige Informationen über die Aggressivität des individuellen Blasentumors bietet. Damit wäre eine maßgeschneiderte Therapie für jeden einzelnen Blasentumorpatienten möglich (Lehmann 2005).

### 1.6.1 **Klassische klinisch-pathologische Faktoren**

**T-Stadium:** Die Ausdehnung und Invasivität des Tumors stellen wichtige prognostische Faktoren dar. Hierbei sind sowohl das tumorspezifische Überleben als auch der progrediente Verlauf abhängig vom Tumorstadium. Oberflächliche Karzinome (pTa) haben die beste Aussicht auf Heilung (5-Jahres-Überlebensrate: 80-90%). Allerdings neigen die oberflächlichen Stadien zu Rezidiven (bis zu 60%). Bei den pT1-Karzinomen ist die 5-Jahres-Überlebensrate etwas niedriger. Sie liegt bei circa 70%. Beim Vorliegen einer Infiltration der Harnblasenmuskulatur (pT2) verschlechtert sich die Prognose rasch. Von den T3 und T4-Tumoren zeigen 40% regionäre Lymphknotenmetastasen (Böcker, 2004).

**N-Stadium:** Das Auftreten von regionären Lymphknotenmetastasen ist eng mit der T-Kategorie korreliert. Je weiter das Karzinom lokal fortgeschritten ist, umso häufiger ist mit Lymphknotenmetastasen zu rechnen. Lymphknotenbefall gilt als ein ungünstiges prognostisches Zeichen. Die prognostische Relevanz des Lymphknotenstatus wird durch mehrere Studien belegt (u.a. Merlin et al 2004; Park et al 2004).

**M-Stadium:** Fernmetastasen sind ein Zeichen dafür, dass das Tumorleiden zu einer systemischen Krankheit geworden ist. Im Allgemeinen ist eine kurative Therapie bei diesen Patienten nicht mehr möglich; die Langzeitüberlebensrate bei Patienten mit metastasierenden Urothelkarzinomen ist praktisch gleich null (Wittekind 1997).

**Histopathologischer Differenzierungsgrad:** Wie der Lymphknotenstatus ist auch der Differenzierungsgrad eng mit dem Tumorstadium korreliert. Nichtinvasive Urothelkarzinome sind in mehr als 60% hochdifferenziert (Differenzierungsgrad G1), im Gegensatz zu muskelinvasiv wachsenden Karzinomen, die in aller Regel mäßig oder schlecht differenziert sind oder undifferenziert sind. (Rübben, 1997). Unabhängig vom Tumorstadium hat der Differenzierungsgrad einen prognostischen Wert für oberflächliche Urothelkarzinome. Grad-1 Karzinome weisen eine geringere Rezidivrate auf. Prognostisch bedeutsam ist auch, dass in 10–30% der Fälle beim Rezidiv eine Abnahme des Differenzierungsgrades zu beobachten ist. Das wird als ungünstiges Zeichen gewertet. Solche Patienten entwickeln im weiteren klinischen Verlauf häufiger muskelinvasive Karzinome (Wittekind 1997).

### 1.6.2 Molekulare Prognosemarker

Molekulare Prognosemarker sind nicht nur als Vorhersagewert für den individuellen Krankheitsverlauf wichtig, sondern sie können auch entscheidende Informationen bezüglich der Wirksamkeit einer medikamentösen Therapie bieten (Lehmann 2005).

**ERCC-1:** Das antineoplastische Potential einer Cisplatin-basierten Chemotherapie beruht auf der Bildung von Platin-DNA-Addukten. Bei einer Cisplatin-Resistenz wirkt das „Nucleotide excision-repair-(NER) System“ dieser Adduktbildung entgegen. In diesem System spielt das ERCC1-Gen eine Schlüsselrolle. In einer Studie von Bellmunt und Kollegen deutete sich an, dass eine hohe Expression von ERCC1 (excision repair cross complementing 1) mit einer hohen Cisplatin-Resistenz einhergeht (Bellmunt et al 2007).

**Emmprin:** Emmprin, auch bekannt als CD 147, gehört zur Proteinfamilie der Immunglobuline und ist auf der Oberfläche von Tumorzellen lokalisiert. In der Tumorgenese konnte gezeigt werden, dass Emmprin an der Regulation verschiedener zellulärer Vorgänge beteiligt ist, wobei dieses Protein eine besondere Bedeutung bei der Induktion von Progression und Metastasierung hat (Nawroth et al 2008).

Als et al konnten in einer 2007 veröffentlichten Studie Emmprin als einen unabhängigen Prognosefaktor beim lokal fortgeschrittenen Harnblasenkarzinom ausmachen. Das untersuchte Patientenkollektiv hatte eine Cisplatin-haltige Chemotherapie erhalten. Hierbei zeigte sich in der Emmprin-positiven Gruppe eine 5-Jahresüberlebensrate von 14,6% in der Emmprin-negativen Gruppe lag diese bei 22,5% (Als et al 2007).



Auch in einer anderen Studie konnte nachgewiesen werden, dass die Emmprin-Expression bei invasiven Harnblasenkarzinomen im Vergleich zu oberflächlichen Tumoren signifikant erhöht ist (Riethdorf et al 2006).

**Survivin:** Survivin, auch als BIRC5 oder API4 bezeichnet, ist ein Apoptose-hemmendes Protein, welches im Wesentlichen von Krebszellen produziert wird. Das für die Expression von Survivin verantwortliche Gen ist 14,7 kb groß und liegt auf dem Chromosom 17q25. Hierbei geht eine erhöhte Survivinexpression mit einer schlechteren Prognose des Harnblasenkarzinoms einher (Akhtar et al 2006). Die schlechte Prognose kann damit begründet werden, dass das anti-apoptotische Protein eine wichtige Rolle in den Resistenzmechanismen gegenüber einer chemotherapeutisch induzierten Apoptose spielt. Die Resistenz gegenüber einer Cisplatin-basierten Chemotherapie konnte unter anderem durch Studien einer dänischen Arbeitsgruppe belegt werden. Die Patienten dieser Studie waren alle an einem lokal fortgeschrittenen Harnblasenkarzinom erkrankt und hatten alle eine Cisplatin-haltige Chemotherapie erhalten. Hierbei lag die mittlere Überlebenszeit bei 9,8 Monaten in der Survivin-positiven Gruppe, in der Survivin-negativ Kontrollgruppe dagegen bei 18,4 Monaten. Ebenso lag die 5-Jahresüberlebensrate in der Survivin-negativen Gruppe mit 27,8% deutlich höher als in der Survivin-positiven Gruppe mit nur 5,1% (Als et al 2007).

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es die Paraffinblöcke aus dem Patientenkollektiv der AUO-AB 05/95 – Studie, welche von M. Stöckle und J. Lehmann geleitet wurde, aus den urologischen Kliniken in ganz Deutschland zusammenzutragen und hieraus ein Tissue-Microarray (TMA) herzustellen. Die hierfür verwendeten Gewebeproben stammten von Patienten, welche an einem lokal fortgeschrittenen invasiven Harnblasenkarzinom erkrankt waren und eine Zystektomie erhalten hatten. Dadurch dass sich alle Gewebepreparate auf einem Block befinden und unter absolut identischen Bedingungen behandelt werden, können diese besser untereinander verglichen und ausgewertet werden.

Ein weiterer Punkt war es, die Auswertungen der immunhistochemischen Analysen, sowie die klinisch-pathologischen Faktoren auf einen Zusammenhang mit den Überlebensdaten hin zu untersuchen und statistisch auszuwerten.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Vorliegendes Material

Zum Zeitpunkt der Fertigstellung der Arbeit lag Material von 327 Patienten in Form von Paraffinschnitten vor, welche an einem fortgeschrittenem Harnblasenkarzinom erkrankt waren und mit einer adjuvanten Chemotherapie behandelt wurden.

Das Material aus dem diese Daten gewonnen wurden, stammt aus Kooperationen mit urologischen Kliniken und Pathologien aus ganz Deutschland. Das untersuchte Patientenkollektiv war zusammengestellt aus Patienten, welche alle in die Studie der Arbeitsgemeinschaft für Urologische Onkologie AUO-AB 05/95 eingeschlossen wurden bzw. in einer weiteren Nachfolgestudie untersucht werden. Diese Studie, die in Homburg koordiniert wurde, konnte zeigen, dass eine adjuvante Therapie mit Cisplatin und Methotrexate die gleiche Effektivität zeigt wie die MVAC-Standardtherapie (Lehmann et al 2005).

Die untenstehende Tabelle gibt einen Überblick über das Tumorstadium bzw. Grading der Tumore, welches in einer Gruppe von 320 bzw. 264 Patienten eindeutig zugeordnet werden konnte.

Stadium	Gesamt (320)
pT1	9 (2,8%)
pT2	47 (14,7%)
pT3	211 (65,9%)
pT4	53 (16,6%)

Grading	Gesamt (264)
G1	0
G2	66 (25%)
G3	198 (75%)

Tabelle 2-1: Übersicht über die Anzahl der jeweiligen Stadien und Gradings in der Versuchsgruppe

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Gewinnung von DNA aus Paraffinmaterial

#### Entparaffinieren der Gewebeschnitte

Für die folgende HE-Färbung und Mikrodissektion musste das Material vom Paraffin gereinigt werden. Hierzu wurden die trockenen Schnitte auf einem Ständer für 30 Minuten bei 72°C inkubiert, wodurch das geschmolzene Paraffin ablief. Zur kompletten Entparaffinierung standen die Schnitte 2-5 Minuten in Xylol und durchliefen anschließend eine absteigende Alkoholreihe (jeweils 1-2 Minuten). Nun konnten die Schnitte für die Mikrodissektion verwendet werden. Auch eine Lagerung in 70 % Alkohol bis zu einer Woche war möglich.

### 2.2.2 HE-Färbung der Schnitte

Die 2 µm dicken Schnitte wurden HE gefärbt. In dieser Färbung konnten die histologischen Strukturen gut beurteilt werden. Die HE-Schnitte dienten als Referenz bei der Mikrodissektion. Bei der HE-Färbung wird Hämatoxylin zu Hämatein oxidiert, welches mit Aluminium-Ionen einen positiv geladenen Komplex bildet. Dieser Komplex lagert sich an die negativ geladenen Phosphatgruppen im Zellkern. Daher färbt sich der Zellkern blau, während das Zytoplasma in der HE-Färbung rot erscheint (Eosin).

#### Vorgehensweise:

1. 10 Minuten Xylol
2. Dehydrierung in absteigender Alkoholreihe (100 %, 96 %, 80 %, 60 %)
3. 1 Minute in dest. Wasser
4. 10 Minuten in Hämatoxylin
5. 25 Minuten Bläuen in Leitungswasser (warm)
6. wenige Sekunden in Eosin
7. Spülen in Leitungswasser (kalt, 2x)
8. Aufsteigende Alkoholreihe (60 %, 80 %, 96 %, 100 %)
9. Xylol
10. Eindeckeln mit Entellan und Deckglas

### 2.2.3 Mikrodissektion und DNA-Isolierung

Bei der Mikrodissektion handelt es sich um eine Technik mit deren Hilfe es möglich ist, bestimmte Gewebebezirke unter dem Stereomikroskop aufzusuchen und zu isolieren. Beim Aufsuchen der gewünschten Areale wird der Referenzschnitt zu Hilfe genommen. Die restlichen Schnitte werden mittels Methylenblau gefärbt, wobei sich Zellkern und Zytoplasma unterschiedlich anfärben. Hat man die gesuchten Areale gefunden, werden diese mit sterilen Nadeln (Microlance) entfernt und in vorbereitete mit 80  $\mu$ l tissue-buffer befüllten 0,5 oder 1,5ml Eppendorf-Cups gesammelt. Zur Entfernung der Proteine und Freilegung der DNA aus den Histonen wurde 20  $\mu$ l Proteinase K zugesetzt und anschließend bei 750 rpm und 55°C über Nacht inkubiert.

Anschließend wurde aus der so erhaltenen Lösung die DNA gewonnen. Die DNA-Gewinnung erfolgte mit Hilfe des „MagNa Pure LC“-Gerätes von „Roche Applied Sciences“. Dieses Gerät dient der vollautomatischen Gewinnung von DNA aus entsprechend angedauten Gewebelösungen. Die DNA-Proben, die aus dem Gerät entnommen werden, können direkt weiter eingesetzt werden.



Abbildung 2-1: „MagNa Pure LC“ von „Roche Applied Sciences“

### 2.2.4 PCR

Die PCR wurde 1985 erstmals von Kary Mulis beschrieben. Sie dient der Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen. Für die PCR werden benötigt:

- ein Paar an Primern, die die Zielsequenz an der 3'-Seite des Matrixstranges flankieren
- eine Polymerase
- die vier Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP's)

Jeder PCR-Zyklus besteht aus drei Einzelschritten:

1. Strangtrennung (Denaturierung) der Ausgangs-DNA durch kurzes (1Minute) Erhitzen auf 94°C
2. Annealing: Hybridisierung der Primer mit der DNA bei der jeweils spezifischen Temperatur
3. Elongation der Primer bei 72°C durch Anheften der komplementären Nukleotide an das freie 3'-Ende in Richtung Zielsequenz

Der Einbezug der thermisch stabilen DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) ermöglichte aufgrund seiner Beständigkeit während der hohen Temperaturen der Denaturationsphase den Ablauf einer Vielzahl solcher Amplifikationszyklen, während beim Einsatz hitzeempfindlicher DNA-Polymerasen diese nach jedem Denaturationszyklus erneut hinzugefügt werden müssen (Herrington 1992).

Um ein Wiederanlagern zweier komplementärer Stränge der Ausgangs-DNA zu verhindern, muss eine hohe Primer-Konzentration vorherrschen. Im Idealfall kann es zu einem exponentiellen Wachstum kommen, da die neu synthetisierten Abschnitte ebenfalls als Matrize dienen. So wäre man nach  $n$  Zyklen eine Anzahl von  $2^n$  erreichen. In der Praxis werden nach 20-30 Runden eine Anzahl von  $10^{6-7}$  erreicht (Stryer 1996).

Die Primer sollten eine Spezifität für den zu amplifizierenden Abschnitt aufweisen. Die Spezifität wird einmal durch die Länge des Primers und durch die Annealing-Temperatur beeinflusst. So sind längere Primer, d.h. aus mehreren Basenpaaren bestehend, zwar spezifischer, da sie sich nicht so häufig an andere Sequenzen anlagern, auf der anderen Seite sind zu lange Primer jedoch ebenfalls kontraproduktiv, da hier durch sterische Behinderung die Hybridisierung erschwert wird. Die ideale Länge beträgt zwischen 18-25 bp. Bei der

Annealing-Temperatur senken zu niedrige Temperaturen die Hybridisierung, zu Hohe Temperaturen verhindern sie.

Nach Greer et al (1994) senkt eine zunehmende Länge des Amplikons bei Material aus Paraffinschnitten die Effizienz der PCR, da hier verstärkt Doppelstrangbrüche auftreten.

Die Standard-PCR:

PCR-Reagenzien	Konzentrationen	Menge
Template-DNA		1-5 µl
Reaktionspuffer	10x	2,5 µl
dNTPs	10 mM	0,5 µl
Primermix	15 µM	0,3 µl
Taq-Polymerase	5 U/µl	0,2 µl
H <sub>2</sub> O Nanopure		16,5-20,5 µl
<b>Gesamt</b>		<b>25 µl</b>

Tabelle 2-2: Master-Mix für die Standard-PCR-Reaktion

Die Angaben aus der obigen Tabelle wurden mit der jeweiligen Probenanzahl multipliziert. Je nach Menge der zugesetzten DNA wurde H<sub>2</sub>O zwischen 16,5 und 20,5µl ergänzt. Nach Erstellung dieses Gesamtreaktionsansatzes (Master-Mix) wurde dieser mittels Vore-TEXer durchmischt und zentrifugiert. Der Ansatz wurde anschließend auf 1,5ml Eppendorf-Cups verteilt. Zu diesem Ansatz wurde im nächsten Schritt die entsprechende Menge DNA zugegeben, erneut gemischt und zentrifugiert (6000 U/min). Die Menge der eingesetzten DNA wurde je nach Stärke der Bandenmuster variiert und die Menge pro Cup mit H<sub>2</sub>O ausgeglichen.

Von dem entstandenen Reaktionsgemisch wurden je 20µl auf 0,5ml Eppendorf-Cups verteilt. Unter Berücksichtigung der jeweiligen Annealing-Temperatur durchliefen die Ansätze folgendes Schema im Thermocycler:

Schritt	Operation
1	94°C, 2 Minuten
2	1°C/s auf 94°C
3	94°C, 1 Minute
4	1°C/s auf AT
5	AT, 1 Minute
6	1°C/s auf 72°C
7	72°C, 1 Minute
8	Gehe zu 2, 34x
9	72°C, 8 Minuten
10	4°C für immer

(AT = Annealing-Temperatur)

Tabelle 2-3: Standard-PCR-Programm

Nach Beendigung des Reaktionszyklus wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank bei 4°C asserviert.



### 2.2.5 Herstellung der Tissue Microarrays (TMAs)

Um allgemein die klinische Relevanz bestimmter Kandidatengene zu evaluieren, sind in der klassischen Tumorpathologie ausgedehnte Studien notwendig, die zeitaufwendig und teuer sind. Die vorhandenen Geweberessourcen (Paraffinblöcke) werden schnell verbraucht. Um eine Gewebeanalyse zahlreicher Tumorproben für viele Kandidatengene zu ermöglichen, wurden in den letzten Jahren sogenannte Tissue Microarrays (TMAs) entwickelt und evaluiert (Kononen et al 1998; Kallioniemi et al 2001; Nocito et al 2001). Bei dieser Technik können zahlreiche Gewebeproben in einen gemeinsamen Paraffinblock gebracht werden. An diesen Arrays können dann verschiedene in situ Methoden zur Validierung differentiell exprimierter Gene durchgeführt werden, i.e. Immunhistochemie oder Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH).

#### 2.2.5.1 Auswählen und Markieren der Gewebeareale

Auf den HE-Schnitten wurden die relevanten Gewebeareale lichtmikroskopisch identifiziert und mit einem Markerstift angezeichnet (Abbildung 2-2). Dabei wurde bei den jeweiligen Patienten das Tumorareal mit dem jeweils höchsten Staging und Grading markiert. Bei den Proben des zugehörigen Normalgewebes wurde möglichst gut erhaltenes Normalurothel ausgewählt.

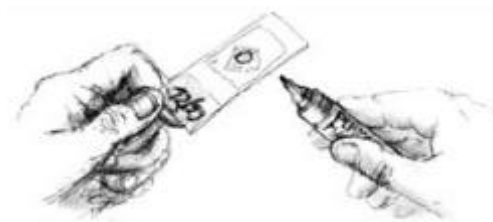


Abbildung 2-2: Markierung der Gewebeareale

Diese Markierung übertrug man auf die Schnittflächen der zugehörigen Paraffinblöcke, indem mit wasserfestem Markerstift flächenhaft das entsprechende Areal eingefärbt wurde (Abbildung 2-3).

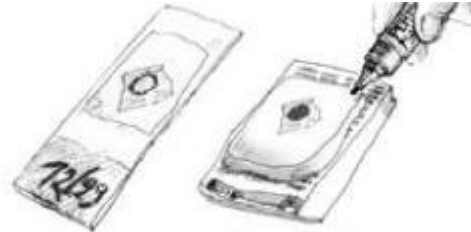


Abbildung 2-3: Markierungsübertragung auf Paraffinblock

### 2.2.5.2 Herstellung der Gewebestanzen

Mit einer Handstanze (Durchmesser 1,4 - 1,5 mm), bei der es sich um eine geschliffene Hohnadel handelt, in der ein Stempel steckt, wurde unter sanftem Druck senkrecht in die farbig markierten Areale des Paraffinblocks circa 5 mm tief gestochen. Um den Gewebestanzzyylinder in der Nadel vom Boden des Blocks abzulösen drehte man die Handstanze mehrfach leicht hin und her und zog dann die Nadel wieder senkrecht heraus (Abbildung 2-4).



Abbildung 2-4: Gewinnung der Gewebestanzen

Durch Druck auf den Stanzstempel wurde die gewonnene Gewebestanze heraus geschoben und in ein nummeriertes Gefäß vorsichtig abgestreift (Abbildung 2-5).

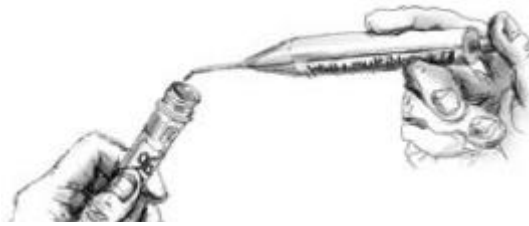


Abbildung 2-5: Befüllen des Gefäßes

### 2.2.5.3 Zuordnung und Archivierung

Unmittelbar nach dem Befüllen des Gefäßes erfolgte der Eintrag wichtiger den entsprechenden Patientenfall betreffender Daten in eine Gewebetabelle, um eine eindeutige Zuordnung von Gewebeprobe und Patientenfall zu gewährleisten.

Im Einzelnen wurden folgende Daten dokumentiert: interne Fallnummer, Histologie-Nummer des Instituts für Pathologie der Universität Regensburg und Jahr der Einsendung. Die Gewebestanden wurden nun in neue Paraffinblöcke eingebracht. Dabei wurde zunächst ein standardisiertes Loch gestanzt (Durchmesser 1,8mm) und anschließend der Gewerbezyylinder eingebracht. Nach leichter Erwärmung erfolgte eine feste Bindung („Einschmelzen“). Zum Schluss wurde das TMA Loch oben mit flüssigem Paraffin verschlossen.

Von den vorliegenden Multiblöcken wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt, um die Position der Tumor- und Normalgewebeproben zu verifizieren. Insgesamt waren mit Hilfe der TMA-Technik 327 Tumorproben auswertbar.

### 2.2.5.4 Gewebepräparation und Antigendarstellung

#### Demaskierung

Die Objektträger wurden zur Demaskierung der Primärantikörper-Bindungsstellen in Zitratpuffer mit einem pH-Wert von 7,1 für vier Minuten (bis die Lösung kocht) in einer Mikrowelle bei maximaler Leistung erhitzt. Darin wurde der Schnitt für zehn Minuten inkubiert.

### Entparaffinisierung

- Waschen der Objektträger für zehn Minuten in frischer Xylol-Lösung
- Waschen in Alkohollösungen absteigender Konzentration für je eine Minute zweimal Ethanol 100%, zweimal Ethanol 96% und einmal Ethanol 70%
- Anschließend mehrmaliges Waschen in Aqua dest.

### Färben der Gewebeproben

- Inkubation für 60 Minuten mit den jeweiligen primären Antikörpern in den oben genannten

### Verdünnungen

- Reinigen mit Waschpuffer (Ventana) für fünf Minuten
- Inkubation für zehn Minuten mit biotinyliertem Sekundärantikörper
- Blockade unspezifischer Bindungsstellen mittels Peroxidase für zwei Minuten
- Reinigen mit Waschpuffer für fünf Minuten
- Inkubation für zehn Minuten mit Enzymkonjugat HRP-Streptavidin
- Reinigen mit Waschpuffer für fünf Minuten
- Inkubation mit dem Chromogen DAB in einer Verdünnung von 1:50 für fünf Minuten

### Konservieren der Präparate

- Auswaschen mit Aqua dest. für fünf Minuten
- Gegenfärbung mit Hämalun für eine Minute
- Reinigen für zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser
- Weiteres Waschen der Präparate in absteigender Alkoholreihe von Xylol
- Konservieren der Präparate mittels Entellan und Deckgläsern

### 2.2.6 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie lokalisiert präzise Epitope bestimmter Antigene, indem sie die Spezifität und Affinität immunologischer Reaktionen nutzt, also die Eigenschaft, dass Antikörper spezifisch und mit hoher Affinität an ihr passendes Antigen binden. Die nicht bindende Seite des Antikörpers kann wiederum als Bindungsstelle für einen weiteren Antikörper genutzt werden, der mit Substanzen konjugiert ist, die man zur Detektion verwenden kann. Es existiert eine Reihe von Verfahren, die sich hinsichtlich der Detektionsreagenzien und der Anzahl an Detektionsschritten (direkte oder indirekte Methode) unterscheiden. In dieser Arbeit kam die sogenannte Avidin-Biotin-Methode an in Paraffin eingebettetem Material zum Einsatz.

Zuerst musste das Gewebe entparaffiniert werden, um die Antigene (p53, Emmprin, Bax, Bcl2) durch geeignete Verfahren freizulegen. Dann wurde ein erster Antikörper, auch Primärantikörper genannt, mit dem Gewebe inkubiert, der spezifisch an das zu untersuchende Antigen bindet (Anti-p53, Anti-Emmprin, Anti-Bcl2 und Anti-Bax). Im Folgenden wurde ein zweiter Antikörper, der auch Sekundärantikörper genannt wird, zugegeben der seinerseits spezifisch gegen den Primärantikörper gerichtet ist und mit Biotin (Vitamin H) konjugiert ist. Biotin wird sehr spezifisch von dem Glykoprotein Avidin gebunden, das pro Molekül je vier Mal Avidin binden kann. Zuletzt fügte man einen Avidin-Biotin-Komplex hinzu, der zum einen mit Peroxidase (Enzym, das aus sauerstoffhaltigen Molekülen Sauerstoff freisetzt) konjugiert ist und zum anderen noch freie Biotin-Bindungsstellen aufweist. Diese können das mit dem Sekundärantikörper verbundene Biotin binden. Nun ließ man die Peroxidase mit einem passenden Chromogen (hier: Diaminobenzidintetrahydrochlorid) reagieren, um diesen Antikörperkomplex sichtbar zu machen. Daraus resultierten sehr spezifische Färbeargebnisse, da die Affinität des Avidins zu Biotin extrem hoch ist. Nach Abschluss dieser Reaktion färbte man die Präparate kurz mit Hämalaun gegen, damit nicht nur die Antikörperkomplexe, sondern auch die histologischen Strukturen erkennbar wurden.

## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Ergebnisse

#### 3.1.1 Klinisch pathologische Daten

Grundlage dieser Arbeit ist das Datenmaterial von 327 Patienten, welche an einem lokal fortgeschrittenen Harnblasenkarzinom erkrankt waren und eine adjuvante Chemotherapie erhalten hatten. Hierbei lag das Patientenalter bei Diagnose im Durchschnitt bei 62 Jahren (28-81J).

Die adjuvante Chemotherapie wurde bei 99 Patienten nach dem CM-Schema (CM: Cisplatin, Methotrexate), bei 105 Patienten nach dem M-VEC Schema (M-VEC: Methotrexate, Vinblastine, Epirubicin, Cisplatin), bei 83 Patienten mit Gemcitabin-Cisplatin und bei 44 Patienten mit Mono-Gemcitabin durchgeführt. Bei einem Großteil der Patienten (60%) zeigte sich ein infiltratives Wachstumsmuster, ein noduläres Tumorwachstum fand man bei 27% und bei circa 9% ein trabekuläres Wachstum.

Zwei Drittel der Tumoren befanden sich bereits im T3-Stadium, die Differenzierung war mit circa 85% überwiegend G3 high grade.

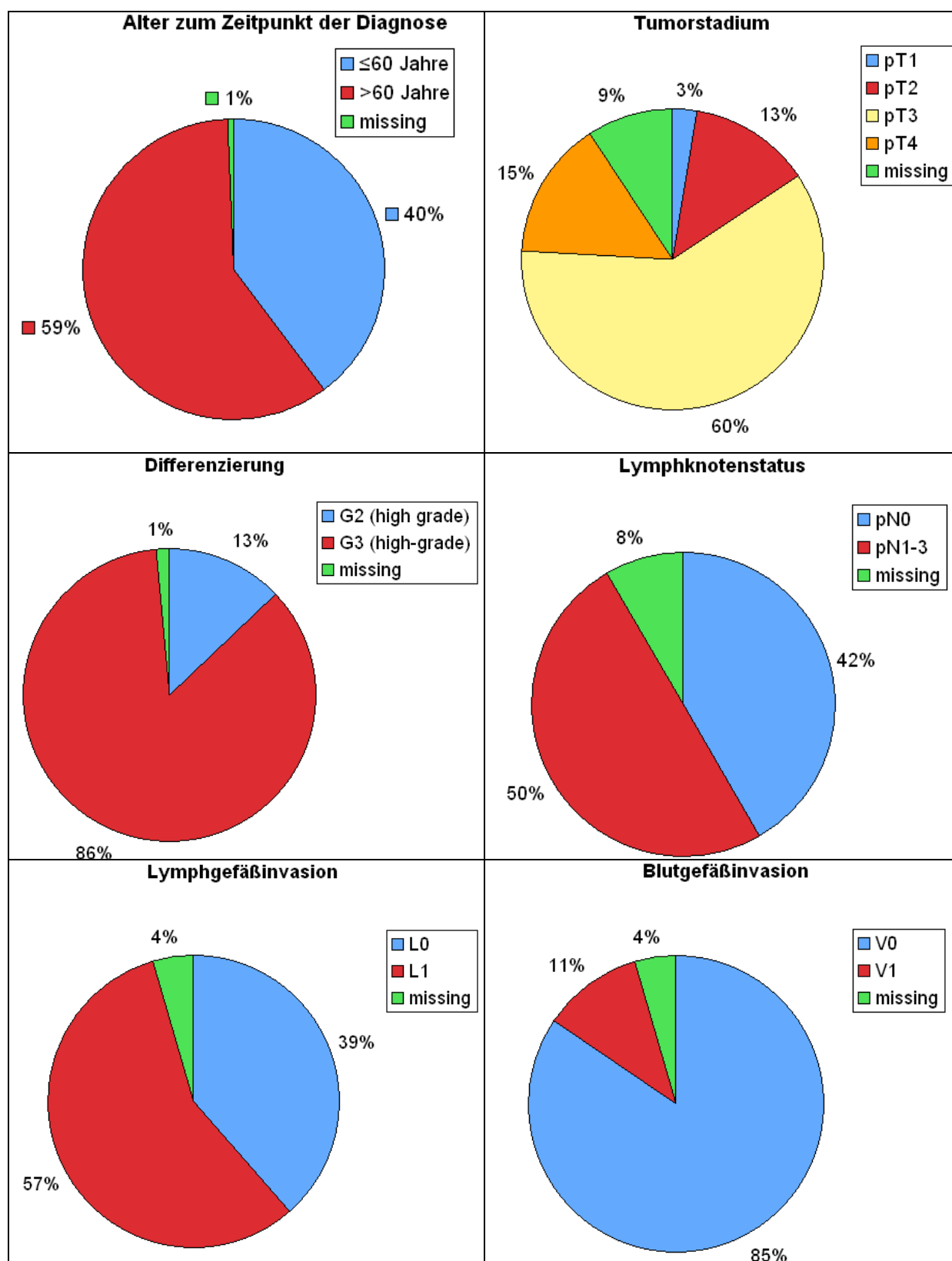
Bei etwa der Hälfte der Patienten hat ein Lymphknotenbefall stattgefunden. Die Lymphgefäße waren bei 57% der Patienten ebenfalls befallen. Eine Blutgefäßinvasion war dagegen nur in 11% der Fälle zu finden.

Variable	Kategorisierung	TMA Studie	
		Analysierte n	%
Klinisch-pathologische Daten:			
Alter zum Zeitpunkt der Diagnose (Median 62 Jahre, variiert von 28-81 Jahren)			
	≤60 Jahre	134	39,8
	>60 Jahre	201	59,6
	missing	2	0,6
Tumorstadium			
	pT1	9	2,7
	pT2	44	13,1
	pT3	203	60,2
	pT4	50	14,8
	missing	31	9,2
Differenzierung			
	G2 (high grade)	44	13,1
	G3 (high-grade)	288	85,5
	missing	5	1,5
Lymphknotenstatus			
	pN0	140	41,5
	pN1-3	169	50,1
	missing	28	8,3
Invasionsmuster			
	nodulär	92	27,3
	trabekulär	32	9,5
	infiltrativ	204	60,5
	missing	9	2,7
Blutgefäßinvasion (V)			
	V0	285	84,6
	V1	37	11,0
	missing	15	4,5
Lymphgefäßinvasion (L)			
	L0	130	38,6
	L1	192	57,0
	missing	15	4,5

Chemotherapieschema			
	M-VEC*	105	31,2
	CM**	99	29,4
	Mono-Gemcitabin	44	13,1
	Gemcitabin-Cisplatin	83	24,6
	missing	6	1,8

Tabelle 3-1 : Patientendaten und Tumorcharakterisierung





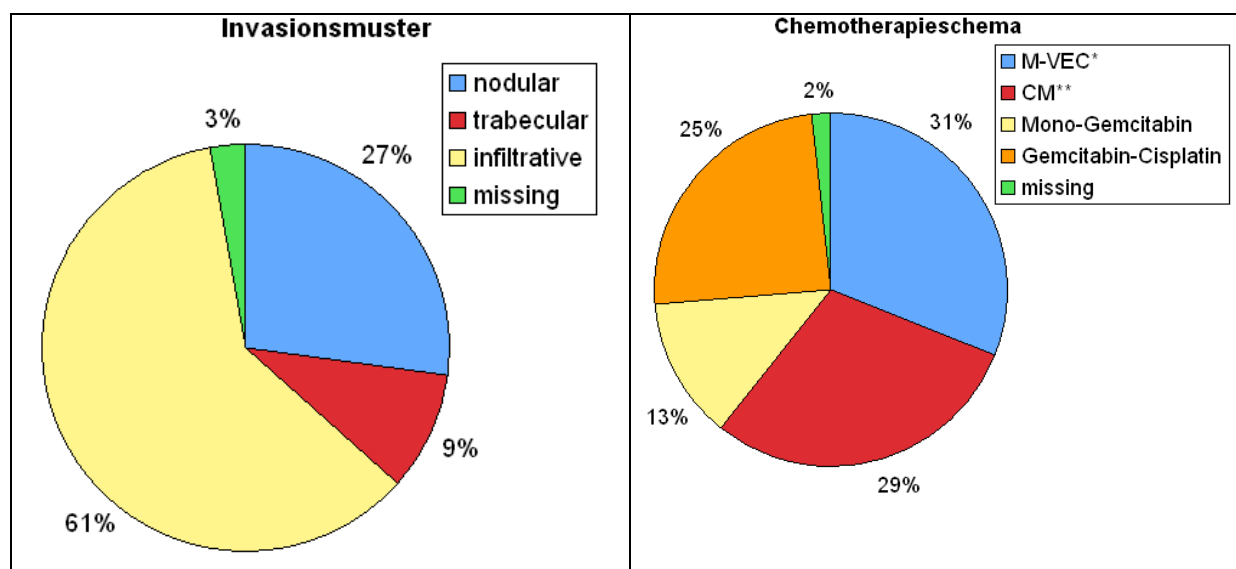


Abbildung 3-1: Klinisch pathologische Daten

### 3.1.2 Immunhistochemische Analysen

Die immunhistochemischen Färbungen der Tumorproben waren bei p53 zu 91%, bei Emmprin zu 86%, bei BAX zu 82% und bei BCL2 zu 81% auswertbar.

Eine positive Emmprin-Expression wurde bei 245 Tumorproben (73%) gefunden. Bei p53 waren 191 Tumorproben (57%), bei BAX 208 (62%) und bei BCL2 30 Proben (9%) positiv.

Variable	Kategorisierung	TMA Studie	
		Analysierte n	%
EMMPRIN IHC (Median 50%, variiert von 0-90%)			
	<10%	44	13,1
	≥10%	245	72,7
	missing	48	14,2
p53 IHC (Median 5%, variiert von 0-95%)			
	<5%	117	34,7
	≥5%	191	56,7
	missing	29	8,6
BAX IHC (Median 50%, variiert von 0-95%)			
	<25%	69	20,5
	≥25%	208	61,7
	missing	60	17,8
BCL2 IHC (Median 0%, variiert von 0-90%)			
	<1%	242	71,8
	≥1%	30	8,9
	missing	65	19,3

Tabelle 3-2: Ergebnisse der immunhistochemischen Analysen

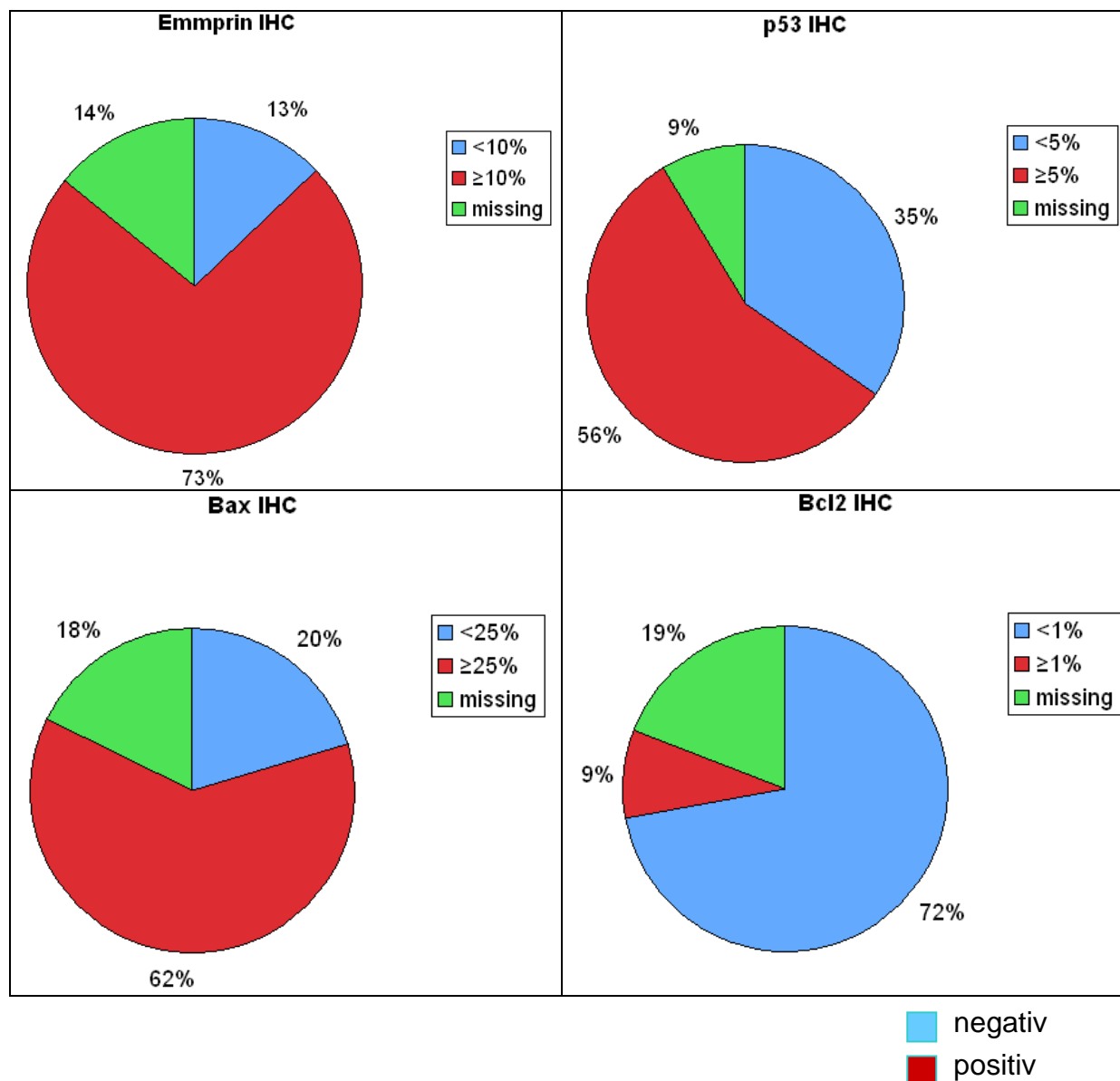


Abbildung 3-2: Ergebnisse der immunhistochemischen Analysen

### 3.1.3 Emmprinexpression im Bezug zu klinisch-pathologischen Daten und zu anderen immunhistochemischen Markern

Für die Datenanalyse wurde der Bezug aller relevanten Variablen zur Emmprin-Immunoreaktivität untersucht. Eine Zusammenfassung der Emmprin-Expression und der Zusammenhang mit den klinisch-pathologischen Daten und anderen Immunmarkern ist in Tabelle 3-3 aufgezeigt.

Hierbei lässt sich erkennen, dass eine Emmprinexpression nur mit einer Blutgefäßinvasion (v0) signifikant verknüpft ist ( $p=0,043$ ) (Abbildung 3-3).

Zwischen den klinisch-pathologischen Daten und den anderen Immunmarkern konnte kein Bezug zur Emmprin-Expression festgestellt werden.

Variable	Kategorisierung	Emmprin IHC		
		<10%	≥10%	p
Klinisch-pathologische Daten:				
Alter bei Diagnose				
	≤60 Jahre	12	105	0,066
	>60 Jahre	32	139	
Tumorstadium				
	pT1	1	6	0,378
	pT2	3	33	
	pT3	28	149	
	pT4	10	34	
Histologische Differenzierung				
	G2 (high grade)	4	33	0,625
	G3 (high-grade)	40	208	
Lymphknotenstatus				
	pN0	18	100	1,000
	pN1-3	23	126	
Invasionsmuster				
	nodulär oder trabkulär	16	92	0,867
	infiltrativ	28	146	
Blutgefäßinvasion (V)				
	V0	34	211	0,043
	V1	10	25	

Lymphgefäßinvasion				
	L0	14	97	0,314
	L1	30	139	
<b>Immunhistochemie (IHC):</b>				
p53 ICH				
	<5%	20	83	0,168
	≥5%	22	148	
BAX ICH				
	<25%	10	51	1,000
	≥25%	31	164	
BCL2 ICH				
	<1%	37	189	0,777
	≥1%	3	23	
bold face representing p-value <0,05				

Tabelle 3-3: Emmprin Immunreaktion im Bezug zu klinisch-pathologischen Daten und zu immunhistochemischen Markern

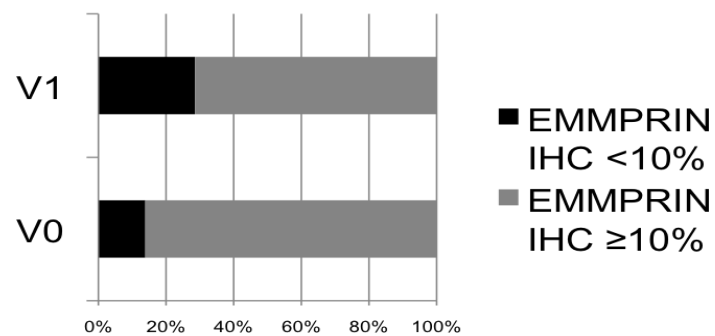


Abbildung 3-3: Emmprinexpression im Bezug zur Blutgefäßinvasion

### 3.1.4 Überlebensanalysen

#### 3.1.4.1 Univariate Analysen

Alle Variablen wurden hinsichtlich ihres Einflusses auf das Gesamtüberleben (Overall survival), das krankheitsspezifische Überleben (Disease-specific survival) und das krankheitsfreie Überleben (Progression-free survival) untersucht (Tabelle 3-4).

Kaplan-Meier Analysen zeigen einen signifikanten Zusammenhang zwischen den Überlebensraten und positivem Lymphknotenbefall ( $p=0,002$ ) bzw. Blutgefäßinvasionen ( $p=0,001$ ) (Abbildung 3-4, Abbildung 3-5).

Im Gegensatz dazu konnte kein Einfluss sowohl des Chemotherapie-Schemas als auch des Wachstumsmusters des Tumors auf das Überleben nachgewiesen werden (Abbildung 3-6).

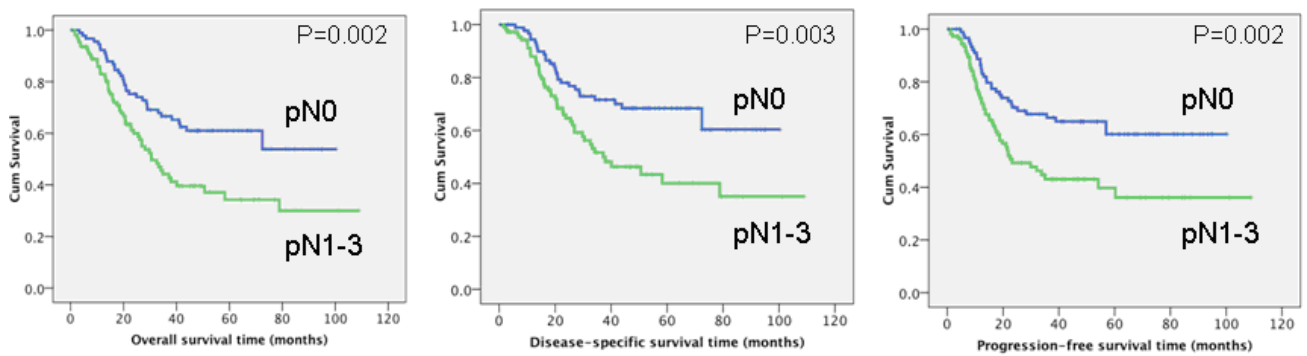


Abbildung 3-4: Univariate Überlebensanalysen im Bezug zu Lymphknoteninvasion

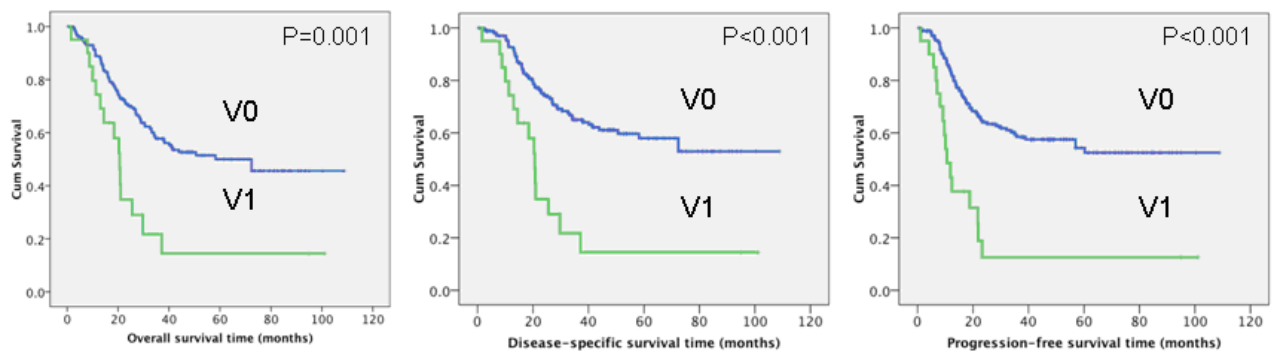


Abbildung 3-5: Univariate Überlebensanalysen im Bezug zu Gefäßinvasion

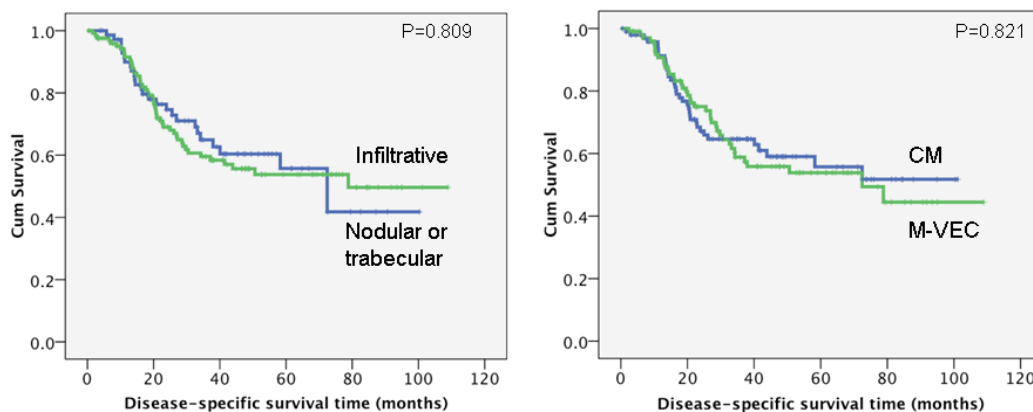


Abbildung 3-6: Univariate Überlebensanalysen im Bezug zum Wachstumsmuster und Chemotherapie-Schema

Variable	Kategorisierung	Gesamtüberleben			Krankheitsspezifisches Überleben			Progressionsfreies Überleben (PFS)		
		n*	events	p**	n*	events	p**	n*	events	p**
Alter bei Diagnose										
	≤60 Jahre	101	46	0,729	101	40	0,830	101	43	0,891
	>60 Jahre	99	47		99	36		99	43	
Tumorstadium										
	pT1-2	30	12	0,689	30	9	0,900	30	11	0,914
	pT3-4	166	79		166	65		166	73	
Histologische Differenzierung										
	G2 (high grade)	24	12	0,915	24	10	0,863	24	10	0,903
	G3 (high-grade)	175	81		175	66		175	75	
Lymphknotenstatus										
	pN0	92	35	0,002***	92	28	0,003***	92	32	0,002***
	pN1-3	108	58		108	48		108	54	
Invasionsmuster										
	nodulär oder trabkulär	74	33	0,818	74	27	0,809	124	56	0,531
	infiltrativ	124	59		124	49		74	29	
Blutgefäßinvasion (V)										
	V0	174	76	0,001***	174	60	<0,001***	174	68	<0,001***
	V1	20	15		20	15		20	16	
Lymphgefäßinvasion										
	L0	80	30	0,058	80	25	0,108	80	28	0,067
	L1	114	61		114	49		114	55	
Chemotherapieschema										
	M-VEC	97	45	0,952	103	40	0,821	97	41	0,809
	CM	103	48		97	36		103	45	
p53 IHC										
	<5%	72	32	0,177	72	107	0,423	72	30	0,366
	≥5%	107	56		107	44		107	51	
BAX IHC										
	<25%	35	23	0,038	35	20	0,027	35	21	0,031
	≥25%	120	53		120	43		120	49	
BCL2 IHC										
	<1%	139	67	0,824	139	55	0,957	139	63	0,660
	≥1%	17	8		17	7		17	7	



EMMPRIN IHC										
	<10%	28	11	0,185	28	11	0,491	28	14	0,897
	≥10%	141	70		141	57		141	63	
*	Only patients receiving either CM or M-VEC chemotherapy were considered.									
**	Log rank test; bold face representing p-values <0,05									
***	Significant after Bonferroni-Holm correction for multiplicity of comparisons									

Tabelle 3-4: Univariate Analysen von Faktoren, welche möglicherweise das Überleben und das Tumorwachstum beeinflussen

### 3.2.1.1 Multivariate Analysen

In einer multivariaten Analyse wurden drei verschiedene Cox-Regressionsmodelle erstellt, welche das Gesamtüberleben (overall survival), das krankheitsspezifische Überleben (disease-specific survival), sowie das krankheitsfreie Überleben (progression-free survival) bewerten. Die Ergebnisse dieser Berechnungen sind in der Tabelle 3-5 aufgeführt.

Fürs Gesamtüberleben ist hierbei nur ein Fehlen der Gefäßinvasion ( $p = 0,011$ ) statistisch signifikant. Dies bedeutet, dass das Risiko zu Versterben um das 3,4fache erhöht ist, wenn eine Blutgefäßinvasion nachzuweisen ist. Nach Rückwärtseliminierung stellt auch die Emmprin-Expression einen negativen Prognosefaktor fürs Gesamtüberleben dar ( $p = 0,043$ ).

Im Berechnungsmodell für das krankheitsspezifische Überleben ist die Blutgefäßinvasion der einzig signifikante Marker ( $p = 0,001$ , nach Rückwärtseliminierung  $p \leq 0,001$ ).

Wenn man das progressionsfreie Überleben betrachtet zeigt sich hier neben der Blutgefäßinvasion ( $p \leq 0,001$ ) auch ein positiver Lymphknotenbefall ( $p = 0,015$ ) als wichtiger Prognosemarker. Die immunhistochemischen Marker zeigen keine Signifikanz für die Überlebensprognosen.

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass eine Blutgefäßinvasion (V1) den aussagekräftigsten negativen Prognosefaktor für Patienten mit lokal fortgeschrittenem Harnblasenkarzinom darstellt. Zum zweiten stellt die Emmprin-Expression einen unabhängigen, negativen Prognosemarker fürs Gesamtüberleben dar.

Diese Ergebnisse bestärken somit die Wichtigkeit der klassischen histologischen Marker als Prognosefaktoren für Patienten mit lokal fortgeschrittenem Blasenkarzinom.

Variable	Kategorisierung*		Gesamtüberleben				Krankheitsspezifisches Überleben				Progressionsfreies Überleben			
			Global P	Rückwärtseliminierungsmodell*			Global P	Rückwärtseliminierungsmodell**			Global P	Rückwärtseliminierungsmodell **		
				Exp(B)	95% Konfidenzintervall	p		Exp(B)	95% Konfidenzintervall	p		Exp(B)	95% Konfidenzintervall	p
Alter bei Diagnose														
	≤60 Jahre	1	0,219	-			0,426	-			0,133	-		
	>60 Jahre	0												
Tumorstadium														
	pT1-2	1	0,550	-			0,278	-			0,430	-		
	pT3-4	0												
Histologische Differenzierung														
	G2 (high grade)	1	0,418	-			0,768	-			0,684	-		
	G3 (high-grade)	0												
Lymphknotenstatus														
	pN0	1	0,177	-			0,051	1,714	0,981-2.993	0,058	0,015	1,331	1.082-3.112	0,024
	pN1-3	0												
Invasionsmuster														
	nodulär oder trabkulär	0	0,968	-			0,867	-			0,621	-		
	infiltrativ	1												
Blutgefäßinvasion (V)														
	V0	0	0,011	3,423	1.810-6.474	<0,001	0,001	3,577	1.884-6.793	<0,001	<0,001	3,753	2.021-6.969	<0,001
	V1	1												
Lymphgefäßinvasion														
	L0	0	0,404	-			0,965	-			0,908	-		
	L1	1												

Variable	Kategorisierung*		Gesamtüberleben				Krankheitsspezifisches Überleben				Progressionsfreies Überleben			
			Global P	Rückwärtseliminierungsmodell*			Global P	Rückwärtseliminierungsmodell**			Global P	Rückwärtseliminierungsmodell **		
				Exp(B)	95% Konfidenzintervall	p		Exp(B)	95% Konfidenzintervall	p		Exp(B)	95% Konfidenzintervall	p
Chemotherapieschema														
	M-VEC	0	0,362	-			0,243	-			0,213	-		
	CM	1												
p53 ICH														
	<5%	0	0,231	-			0,554	-			0,264	-		
	≥5%	1												
BAX ICH														
	<25%	0	0,250	-			0,550	-			0,536	-		
	≥25%	1												
BCL2 ICH														
	<1%	0	0,991	-			0,960	-			0,839	-		
	≥1%	1												
EMMPRIN ICH														
	<10%	0	0,056	2,042	1.022-4.077	<b>0,043</b>	0,128	-			0,400	-		
	≥10%	1												
* Only patients receiving either CM or M-VEC chemotherapy were considered.														
** Limit for reverse selection procedures p=0,01; -, excluded from the model; bold face representing p-values <0,05; CI, conficende interval.														

Tabelle 3-5: Multivariate cox-regression Analyse

## 3.2 Diskussion

### 3.2.1 **Verwendung von Tissue-Microarrays**

Die Grundlage für die TMA-Technik wurde im Jahre 1986 von Battifora und seinen Mitarbeitern gelegt. Mit Hilfe der von ihm beschriebenen „Sausage“-Technik“ wurden damals noch eine geringere Anzahl (bis zu 100) größerer Gewebeproben in einen Paraffinblock eingebracht (Battifora et al 1996).

Diese Technik wurde durch Kononen et al 1998 weiterentwickelt, so dass heute bis zu 1000 Gewebeproben auf einen Objektträger aufgebracht und simultan untersucht werden können (Kononen et al 1998). Dadurch, dass sich alle Gewebeproben in einem Block befinden, entstehen mehrere Vorteile. So kann man die einzelnen Probeausschnitte besser untereinander vergleichen und auswerten, da alle Proben absolut gleich behandelt werden. Durch die zeitgleiche Analyse entsteht ein Zeitersparnis und es werden weniger Antikörper und Reagenzien verbraucht, was die Kosten der Untersuchung senkt. Des Weiteren ermöglicht die TMA-Technik den ökonomischen Umgang mit seltenen und wertvollen Geweben, indem lediglich kleine Teile ausgestanzt werden. Eine spätere Forschungsarbeit oder die Dokumentation des Patientenfalls ist weiterhin möglich (Rimm et al 2001).

Dem Zeitgewinn der Probenanalyse entgegensustellen ist jedoch die Tatsache, dass die Vorbereitung und Erstellung eines Tissue-Arrays deutlich mehr Zeit als eine herkömmliche Schnitterstellung benötigt. Es ist erforderlich, dass alle Proben vor der Arrayerstellung im Lichtmikroskop durchgesehen und die, für die Fragestellung relevanten Areale markiert werden. Dieses Aufsuchen der infrage kommenden Areale würde aber bei der Auswertung von herkömmlichen Schnitten dennoch stattfinden und bedeutet somit keinen wirklichen Zeitverlust. Auch das Herausstanzen der Proben stellt einen zusätzlichen, wenn auch geringen Zeitaufwand dar. Bei der Methode der Multi-Arrays entfällt die Möglichkeit, nachträglich benachbarte Gebiete der Stanze zu evaluieren, wenn sich erst durch die Untersuchung herausstellen sollte, dass diese von Interesse wären.

Die Technik kann sowohl bei Paraffin-, als auch bei Gefrierschnitten angewandt werden. Hierbei ermöglichen immunhistochemische Untersuchungen, FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) oder RNA-in-situ-Hybridisierung ein beinahe unbegrenztes Potenzial an möglichen Analysen. Die Hybridisierungs- und Färbeprotokolle, welche auch bei den

üblichen Gewebeschnitten angewendet werden, müssen dabei nicht abgeändert werden (Nocito, Kononen et al 2001).

Die Gewebeproben eines Gewebemikroarrays stellen jeweils nur einen kleinen Ausschnitt des jeweiligen Tumors dar. Deshalb wurden auch bei Einführung dieser Technik Zweifel an der Validität des Verfahrens geäußert (Bubendorf et al 2001; Horvath et al 2001). So wurde gegen die Technik eingewandt, dass sie, vor allem bei Untersuchungen von Tumoren mit heterogener Morphologie, das untersuchte Gewebe auf eine dünne Gewebescheibe mit einem Durchmesser von 0,6mm reduziere, die hinsichtlich ihrer Proteinexpression nicht mehr repräsentativ für den Ursprungstumor sei. Es wurde jedoch von zahlreichen Wissenschaftlern wie Schraml et al (1999), Kononen et al (1998), Gillet (2000), Torhorst (2001) und Moch et al (2001), übereinstimmend belegt, dass dieses Verfahren eine hohe Konkordanz mit herkömmlichen Gewebeanalysen aufweist und die Technologie somit für die Erforschung unterschiedlicher Tumorentitäten geeignet ist.

Mit der TMA-Technik ist es möglich, spezifische Gewebemuster gemeinsam mit klinischen Daten, Behandlungsmodalitäten und Überlebensdaten in hoher Zahl für die Forschung verfügbar zu machen. Hierbei gibt es verschiedene Gestaltungsmöglichkeiten des TMAs. So kann man zum Beispiel Multi-Tumorarrays erstellen, bei denen man Tumoren verschiedener Gewebe und Organe simultan über die Expression von Proteinen und Enzymen untersucht und somit Informationen über die Tumorgenese erhält. Derartige Kollektivuntersuchungen wurden unter anderem von Schraml et al (1999) erfolgreich durchgeführt. Des Weiteren kann man mit Hilfe eines TMAs Tumorgewebeproben von Patienten, für die im Rahmen eines Nachbeobachtungszeitraums klinische Daten wie Zeitpunkt des Tumor-Rezidivs, Therapieverlauf, Zeitpunkt der Metastasierung oder Überlebenszeit verfügbar sind, auf Zusammenhänge zwischen molekularen Markern und klinischen Verläufen untersuchen. Dadurch sind prognostische Aussagen möglich, wie Studien zeigen konnten (Nocito, Kononen et al 2001).

Mit der Erstellung des Progressions-relevanten TMA von Urothelkarzinomen war die gleichzeitige Untersuchung vieler verschiedener Gewebeproben unter völlig identischen Bedingungen möglich. Eine Anzahl von 327 Gewebeproben konnte auf lediglich 6 TMAs verteilt werden. Durch die definierte symmetrische Anordnung der Gewebestanzten auf dem Multiblock bestand eine gute Übersicht und war eine bessere Vergleichsmöglichkeit der einzelnen Proben untereinander möglich. Dies hat sich bei der semiquantitativen Auswertung

der immunhistochemischen Färbungen bestätigt. Die Markierungen konnten gut beurteilt bzw. ausgezählt werden.

### **3.2.2 Verwendung von klassischen histopathologischen Prognosemarkern**

Eine Metastasierung der regionären Lymphknoten nach lymphovaskulärer Invasion kann beim muskelinvasiven Harnblasenkarzinom als Indikator für eine ungünstige Prognose angesehen werden. In diesem Patientenkollektiv lag bei etwa 50% ein positiver Lymphgefäß- bzw. Lymphknotenbefund vor. In der univariaten Analyse bestätigte sich, dass ein Lymphknotenbefall signifikant mit einer schlechteren Überlebensprognose einhergeht ( $p=0,002$ ). Die Untersuchung der Lymphgefäßinvasion unabhängig vom Lymphknotenstatus, hatte keine signifikante prognostische Relevanz. In anderen Studien konnte eine Lymphgefäßinvasion als wichtiger Prognosefaktor aufgezeigt werden (Leissner et al 2003; Lotan et al 2005; Quek et al 2005). Alloussi et al konnten 2011 in einer retrospektiven Untersuchung ebenfalls darlegen, dass ein positiver Lymphknotenbefall mit einem kürzeren Überleben einhergeht.

Ein weiteres wichtiges histopathologisches Kriterium für die Prognose des Krankheitsverlaufes ist die Untersuchung der Blutgefäßinvasion der Tumorzellen.

In dieser Studie war der Nachweis einer Blutgefäßinvasion (V1) ein relativ seltenes Ereignis (11%), jedoch korrelierte es in den uni- und multivariaten Analysen signifikant mit einer kürzeren Gesamtüberlebenszeit. Das Risiko zu Versterben ist bei einer positiven Blutgefäßinvasion um das 3,4fache erhöht.

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass eine Blutgefäßinvasion (V1) in dieser Arbeit den aussagekräftigsten negativen Prognosefaktor für Patienten mit lokal fortgeschrittenem Harnblasenkarzinom darstellt und als Zeichen einer systemischen Ausbreitung des Tumors zu werten ist.

Da die Identifikation einer Lymph- bzw. Blutgefäßinvasion manchmal schwierig sein kann (Bostwick DG, Cheng L, 2008) können bei Zweifeln zusätzlich immunhistochemische Methoden mit Gefäßmarkern (z.B. CD319) und Lymphgefäßmarkern (z.B. D2-40) eingesetzt werden.

In der Literatur wird eine Lymph- bzw. Blutgefäßinvasion ebenfalls als wichtiger Prognosefaktor beim Blasenkarzinom angesehen (Leissner et al 2003; Lotan et al 2005; Quek et al 2005). Bell et al zeigten, dass die 5-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit einer

Gefäßinvasion niedriger war als bei der Vergleichsgruppen mit einer fehlenden Gefäßinvasion (23% vs. 51%).

Das Grading des Blasentumors wird ebenfalls in der histopathologischen Routinediagnostik durchgeführt. In der vorliegenden Studie konnte jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem histologischen Differenzierungsgrad und einem positiven bzw. negativen Krankheitsverlauf nachgewiesen werden. Dies mag auch daran liegen, dass die Mehrzahl (ca. 86%) der fortgeschrittenen Tumoren als G3 bzw. high grade eingestuft wurde und das Grading in dieser Arbeit somit kein signifikantes Kriterium darstellt.

Beim Wachstum der Blasentumore wurden sowohl infiltrative (61%), als auch noduläre (27%), als auch trabekuläre (9%) Muster beobachtet. Das Invasionsmuster war in dieser Serie von fortgeschrittenen Urothelkarzinomen jedoch ebenfalls ohne Bedeutung. Dies kann jedoch auch an der Therapie des Patientenkollektivs liegen (radikale Zystektomie + adjuvante Chemotherapie).

In der Literatur wurden einzellige Infiltrationen als Ausdruck einer epithelialen mesenchymalen Transition sowohl beim T1-Karzinom (Denzinger et al 2009), als auch im fortgeschrittenen Urothelkarzinom der Blase und des oberen Harntrakts (Krüger et al 2004; Langner et al 2006) beschrieben.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass die Bestimmung der klassischen histopathologischen Parameter in der Prognoseabschätzung des invasiven Harnblasenkarzinoms sinnvoll ist. Die Gefäßinvasion ist auch in der multivariaten Analyse assoziiert mit einer schlechten Prognose beim fortgeschrittenen Urothelkarzinom. Eine Chemotherapie ist hier allerdings nur eingeschränkt erfolgreich - hier sind Studien mit neuen Tumorthapien indiziert, die bei den Patienten mit Hämangioinvasion durchgeführt werden sollten.

### **3.2.3 Verwendung von molekularen Prognosemarkern**

Neben den klassischen histopathologischen Prognosefaktoren tragen auch molekulare Marker dazu bei das biologische Verhalten jedes Blasentumors zu charakterisieren und ermöglichen somit auch eine individuelle Risikoabschätzung und Therapieempfehlung.

Wichtige molekulare Marker sind beispielsweise die Tumorsuppressorgene p53 und Rb1 (Retinoblastom), welche eine Schlüsselrolle in der Zellzyklusregulation einnehmen. Das Retinoblastomgen war das erste Tumorsuppressorgen, welches bei humanen Karzinomen



entdeckt wurde. Die Inaktivierung von Rb1 wird in der Literatur als ein entscheidender Schritt in der Karzinogenese urothelialer Tumoren beschrieben (Bagchi et al 1991; Brandau et al 2001). Cordon-Cardo et al fanden 1992 in einer Studie mit 38 Patienten heraus, dass eine verminderte Rb-Expression in muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen mit einer signifikant verkürzten tumorfreien Überlebenszeit korreliert. In einer anderen Studie mit 43 Patienten, zeigten sich ähnliche Ergebnisse (Logothetis et al 1992). In der vorliegenden Arbeit wurde Rb1 jedoch nicht immunhistochemisch untersucht.

Das Tumorsuppressorgen p53 wurde beim Blasenkarzinom von allen Prognosemarkern am häufigsten und intensivsten untersucht. In den allermeisten Krebserkrankungen sind p53-Mutationen vorzufinden, durch welche das Protein seine Funktion als „Wächter der DNA und des Zellzyklus“ verloren hat, und so ein dereguliertes Wachstum von Tumorzellen möglich wird. Untersuchungen hierzu konnten belegen, dass ein immunhistochemischer Nachweis von p53 als wichtiger Prognosefaktor für die Tumorprogression gilt (Knowles et al 1998; Lipponen et al 1993; Sarkis et al 1995). Zudem ist eine erhöhte p53-Expression verbunden mit einem erhöhten Rückfallrisiko bzw. mit einer verkürzten Gesamtüberlebenszeit (Esrig et al 1994; Llopis et al 2000).

Demgegenüber existieren auch Arbeiten, welche in multivariaten Analysen keine prognostische Signifikanz für p53 zeigen konnten (Gontero et al 2000; Stavropoulos et al 2002). Trotz einer Vielzahl von Veröffentlichungen zu diesem Thema, herrscht noch immer keine eindeutige Klarheit über den prognostischen Wert von p53. Schmitz-Dräger verglichen 2000 in eine Metaanalyse hierzu 43 Studien mit insgesamt 3764 Patienten und erhielten sehr kontroverse Ergebnisse. Dies mag wohl auch an den unterschiedlichen, nicht standardisierten Studiendesigns liegen. In der vorliegenden Arbeit zeigten in der immunhistochemischen Untersuchung rund 57% der Fälle eine positive p53 Expression, jedoch ergaben die Berechnungen keine prognostische Relevanz.

Auch eine große prospektive Studie bei Patienten mit fortgeschrittenem Urothelkarzinom und adjuvanter Chemotherapie konnte keine prognostische oder prädiktive Aussagekraft von p53 zeigen (Stadler et al 2011).

Neben den Tumorsuppressorgen, wurden beim Blasenkarzinom unter anderem auch die zu den Onkogenen zählenden Apoptoseregulatoren Bcl-2 und Bax als potentielle Prognosemarker untersucht. Die Proteine der Bcl-2-Familie lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: Proapoptoseproteine (Bax, Bad, Puma), welche die Apoptose fördern und

Antiapoptoseproteine (Bcl-2, Bcl-xL, SURVIVIN, LIVIN), welche diese inhibieren. In gesunden Zellen stehen diese beiden Subklassen im Gleichgewicht und regulieren den programmierten Zelltod. In Tumorzellen findet man häufig eine Überexpression von Bcl-2 Proteinen. Dieses Ungleichgewicht zwischen Pro- und Antiapoptoseaktivität führt letztendlich dazu, dass kein Zelltod stattfindet und die Tumorzelle ungehindert proliferieren kann. Betrachtet man die Literatur über die Expression des Onkoproteins Bcl-2 und dessen Wertigkeit als Prognosefaktor, so findet man uneinheitliche Ergebnisse. Eine Bcl-2 Überexpression wurde in 41% (Liukkonen et al 1997) bis 68% (Lipponen et al 1996) der Harnblasenkarzinome entdeckt. Es konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen einer positiven Bcl-2-Immunreaktion und den histopathologischen Parametern (T-Stadium, Differenzierungsgrad) beschrieben werden (Liukkonen et al 1997; King et al 1996). Auch eine Assoziation zwischen einer Bcl-2-Überexpression und dem Auftreten von Rezidiven bzw. einer kürzeren tumorfreien Überlebenszeit konnte untersucht werden (Ong et al 2001; Wolf et al 2001).

Demgegenüber stehen Veröffentlichungen, welche weder einen Zusammenhang zwischen Bcl-2-Expression und dem Tumorstadium bzw. Differenzierungsgrad fanden, noch einen Einfluss auf die Gesamtüberlebenszeit bzw. die tumorfreie Überlebenszeit nachweisen konnten (Asci et al 2001; Cooke et al 2000; Korkolopoulou et al 2002; Shiina et al 1996).

Beobachtet man auf der anderen Seite eine Überexpression von Bax, so konnten verschiedene Studien in diesem Fall einen signifikant günstigeren Krankheitsverlauf bescheinigen. Ein Zusammenhang mit den histopathologischen Parametern wurde jedoch nicht gefunden (Hussain et al 2003; Korkolopoulou et al 2002; Giannopoulou et al 2002).

Ein weiterer interessanter Aspekt ist, dass die Bcl-2-Familie auch mit der Therapieresistenz von Tumorzellen in Verbindung gebracht werden kann. Die Wirkung von Chemotherapeutika und Bestrahlung beruht darauf, dass sie eine Apoptose in den malignen Zellen auslösen. Durch eine erhöhte Bcl-2-Expression bzw. eine verringerte Bax-Expression kann diese apoptotische Wirkung jedoch blockiert werden und der Tumor zeigt somit kein Ansprechen auf die Behandlung (Reed 1995). Pollack et al veröffentlichten 1997 hierzu eine Studie, in welcher ein Bcl-2-Überexpression signifikant verknüpft war mit einer Tumorprogression, während einer Bestrahlungstherapie. Auf das Ansprechen einer kombinierten Radiochemotherapie zeigten sich jedoch keine Auswirkungen. In einer späteren Studie von Hussain et al (2003) konnte eine Bcl-2- Überexpression jedoch als unabhängiger Indikator für ein kürzeres tumorfreies Überleben bestätigt werden, bei Patienten mit einem invasiven Harnblasenkarzinom, welche eine synchrone Radiochemotherapie erhielten.

In unserer Arbeit wiesen die immunhistochemischen Auswertungen für Bcl-2/Bax jedoch keine Signifikanz für die Überlebensprognosen auf.

Einen weiteren interessanten molekularen Prognosemarker stellt das zu den Immunglobulinen gehörende Membranprotein Emmprin (CD147, „extrazellulär matrix metalloproteinase inducer“) dar. Funktionell wird durch Emmprin unter anderem eine Expression von Matrix-Metalloproteinasen induziert, deren Aktivität wiederum für eine Tumorprogression verantwortlich gemacht wird. Beim Blasenkarzinom wurde eine, im Vergleich zum Normalurothel, erhöhte Emmprin-Expression nachgewiesen (Muraoka et al 1993). Hierbei ist die Emmprin-Expression in invasiven Blasenkarzinomen signifikant höher als in oberflächlichen Tumoren (Riethdorf et al 2006). Die Arbeitsgruppe um Misra konnte 2003 zeigen, dass Emmprin sowohl zu einer Wachstumsinduktion, als auch zu einer Therapieresistenz führt. Dies geschieht über eine Hyaluron abhängige Beeinflussung des Phosphatidylinositol 3Kinase/Akt-Signaltransduktionsweges. Auch bei anderen Tumorentitäten, wie z.B. bei Karzinomen des Magens, des Ösophagus, der Ovarien oder bei Melanomen, Gliomen oder auch in Fällen einer akuten lymphatischen Leukämie konnten Forschungen eine erhöhte Emmprin-Expression nachweisen, welche mit einer Tumorprogression und Tumormetastasierung assoziiert waren (Zheng et al 2006; Ishibashi et al 2004; Davidson et al 2003; Kanekura et al 2002; Sameshima et al 2000; Beesley et al 2005). Eine dänische Forschergruppe konnte in einer Genexpressionsanalyse mit 124 Patienten belegen, dass eine vorhandene Emmprin-Expression einen unabhängigen prognostischen Marker fürs Gesamtüberleben bei Patienten mit fortgeschrittenem invasivem Harnblasenkarzinom darstellt. Zusätzlich wurde in der Studie noch das Ansprechen auf die cisplatinhaltige Chemotherapie, welche das gesamte Patientenkollektiv erhalten hatte, in Abhängigkeit auf die Emmprinexpression untersucht. Die 5-Jahres-Überlebensrate lag in der Emmprin-positiven Gruppe bei 14,6% und bei den Emmprin-negativen Fällen bei 22,5%. Somit zeigt sich Emmprin als signifikanter Prognosemarker für den Therapieerfolg (Als et al 2007).

In der vorliegenden Studie war eine Emmprinexpression in 73% der Fälle nachzuweisen, wobei diese signifikant mit einer positiven Blutgefäßinvasion verknüpft war. Im Bezug aufs Gesamtüberleben stellte Emmprin einen unabhängigen negativen Prognosefaktor dar.

Ebenso konnten chinesische Arbeitsgruppen in kürzlich veröffentlichten Studien die prognostische Bedeutung von Emmprin belegen und damit nochmals dessen Potential als therapeutisches Target Molekül unterstreichen (Xue YJ et al 2010; Zhong et al 2010).

Molekulare Biomarker werden jedoch nicht nur dafür verwendet um eine eventuelle Tumorprogression vorauszusagen, sondern mit ihnen können auch mögliche Chemotherapieresistenzen vorab prognostiziert werden.

So wirkt zum Beispiel das apoptoseinhibierende Protein Survivin (BIRC5), welches häufig in Tumorzellen nachgewiesen wird, dem zytotoxischen Effekt einer Chemotherapie entgegen.

Eine hohe Survivin-Expression korreliert somit mit einer schlechteren Prognose für den Patienten. Dies wurde nicht nur für das Blasenkarzinom untersucht (Akhtar et al 2006), sondern konnte auch für andere Malignome nachgewiesen werden (Kennedy et al 2003; Lee et al 2005; Kren et al 2004). Besonders zu erwähnen wäre hier nochmals die Genexpressionsuntersuchung von Als et al 2007. In dieser wurde neben Emmprin, auch Survivin als wichtiger unabhängiger Prognosemarker für das Therapieansprechen und die Überlebensprognose bei Patienten mit einer cisplatinhaltigen Chemotherapie identifiziert.

Ganz aktuell konnten amerikanische Forscher ein Modell aus 20 Genen entwickeln, mit dessen Hilfe sie das Auftreten von Lymphknotenmetastasen voraussagen können. Die Gensignatur wurde anhand eines Phase-3-Patientenkollektivs (AUO-AB-05/95 185 Patienten) auf ihren Vorhersagewert bezüglich der Entwicklung von Lymphknotenmetasen überprüft und fand eine signifikante Korrelation der Genexpressionsanalyse und einem positiven Lymphknotenbefall und dem Überleben der Patienten. Anhand dieser Ergebnisse könnte man Hochrisikopatienten identifizieren, denen eine neoadjuvante Chemotherapie von Nutzen wäre, anderen Patienten könnte dieser toxische Eingriff wiederum erspart bleiben (Smith et al 2011).

Anhand derselben Phase-3 Studie, auf welcher auch unsere Arbeit basiert, untersuchten Hoffmann et al 2010 die Genexpression von MDR1 und ERCC1 und deren Einfluss auf die Prognose bei Patienten mit einem fortgeschrittenen Harnblasenkarzinom, welche eine adjuvante cisplatinbasierte Chemotherapie erhielten. ERCC1 (excision repair cross-complementing 1) ist ein DNA-Reparaturenzym, welches Sequenzfehler erkennt und korrigiert. Durch diesen Reparaturmechanismus können DNA-Schäden behoben werden, welche durch platinhaltige Komponenten induziert wurden. Man kann also sagen, dass das Gleichgewicht zwischen DNA-Schaden und DNA-Reparatur das Überleben der Tumorzelle und somit auch das Gesamtüberleben nach einer cisplatin basierten Chemotherapie bestimmt (Metzger et al 1998). In vielen retrospektiven und einigen prospektiven Studien bei Patienten

mit nichtkleinzelligem Lungenkrebs, kolorektalem Karzinom oder auch Blasenkrebs, welche eine platinhaltige Chemotherapie erhalten hatten, konnte eine Korrelation zwischen der ERCC1-Expression und den Überlebensprognosen aufgezeigt werden (Bellmunt et al 2007; Cobo et al 2007; Simon et al 2007).

Das MDR1-Gen (multi drug resistance gene) kodiert für das Membranprotein P-Glykoprotein (PGP), welches als Transporter toxische Substanzen aus der Zelle pumpt. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass eine erhöhte PGP-Aktivität dem zytotoxischen Effekt einer Chemotherapie entgegenwirkt und somit den Therapieerfolg mindert.

Bezüglich des invasiven Harnblasenkarzinoms konnten Hoffmann et al 2010 in ihrer retrospektiven Studie nachweisen, dass sowohl eine hohe MDR1-, als auch ERCC1-Genexpressionsrate mit einer schlechteren Überlebensprognose nach einer cisplatinbasierten adjuvanten Chemotherapie einhergeht.

Hierzu wäre es sinnvoll weitere prospektive Studien über die ERCC1-/MDR-Expression durchzuführen, mit deren Hilfe man dann möglicherweise ein Patientenkollektiv auswählen kann, welches von einer adjuvanten Chemotherapie profitiert.

## 4 Zusammenfassung und Ausblick

Für die Klinik bei der Behandlung von Patienten mit einem invasiven Urothelkarzinom ist es notwendig, Erkrankte in Risikogruppen zu stratifizieren, um somit die individuell richtige Therapie zu wählen und Nachsorgepläne erstellen zu können.

Grundlage dieser Arbeit, war das Datenmaterial von 327 Patienten, welche alle an einem invasiven Harnblasenkarzinom erkrankt waren und eine adjuvante Chemotherapie erhalten hatten. Aus den paraffineingebetteten Tumorgewebeproben wurden sogenannte Tissue Microarrays hergestellt, welche im Anschluss immunhistochemisch untersucht worden sind.

Es konnte nachgewiesen werden, dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen einem positiven Lymphknotenbefall und der Überlebensrate besteht. Auch eine Blutgefäßinvasion des Tumors konnte als negativer Prognosemarker fürs Überleben aufgezeigt werden. Es wurde berechnet, dass das Risiko zu Versterben um das 3,4fache erhöht ist, wenn eine Blutgefäßinvasion stattgefunden hat.

Dahingegen konnte keine Beeinflussung durch das Chemotherapieschema oder das Wachstumsmuster des Tumors auf das Überleben nachgewiesen werden.

Im Hinblick auf die molekularen Prognosemarker haben die Ergebnisse gezeigt, dass eine Emmprin-Expression mit einer negativen Prognose fürs Gesamtüberleben verknüpft ist. Die anderen untersuchten immunhistochemischen Marker (bax, p53, bcl2) zeigten keine Signifikanz für die Überlebensprognosen.

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass erstens eine Blutgefäßinvasion den aussagekräftigsten negativen Prognosefaktor für Patienten mit lokal fortgeschrittenem Harnblasenkarzinom darstellt. Zum zweiten stellt die Emmprin-Expression einen unabhängigen negativen Prognosemarker fürs Gesamtüberleben dar.

Mit diesen Ergebnissen konnten wir zeigen, dass die klassischen histologischen Marker weiterhin als wichtige Prognosefaktoren für Patienten mit lokal fortgeschrittenem Urothelkarzinom gelten. Des Weiteren kann eine immunhistochemisch nachgewiesene Emmprin-Expression dabei helfen Hochrisikopatienten zu identifizieren und somit die entsprechenden Therapiemaßnahmen zu ergreifen. Hierzu zählt z.B. die Behandlung mit einer adjuvanten Chemotherapie neben der Zystektomie, welche bei muskelinvasiven Blasenkarzinomen standardmäßig durchgeführt wird. Die Chemotherapie soll verhindern, dass sich der Tumor weiter ausbreitet bzw. Rezidive entstehen. Da diese sehr toxische Therapie jedoch auch entsprechende Nebenwirkungen mit sich bringt, wäre es sinnvoll diese

nur bei vorab stratifizierten Risikopatienten anzuwenden und den anderen Patienten diese zu ersparen.

Alternativ könnten bei Fällen, in welchen eine Chemoresistenz und eine schlechte Prognose vorliegen, neue sogenannte Target-Therapieansätze zum Einsatz kommen. Bei dieser gezielten Krebstherapie werden mit Hilfe von Antikörpern oder von „Small-Interference-Oligonukleotiden“ die molekulargenetisch veränderten Tumorzellen direkt inhibiert. So konnte in präklinischen Versuchsreihen, durch eine Inaktivierung von Emmprin, ein verringertes Tumorwachstum bei Melanomen, Kopf-, Hals- und Lungenkarzinomen erzielt werden (Dean et al 2009; Kanekura et al 2010; Sidhu et al 2010). Beim Leberkarzinom wurde bereits in einer ersten Phase-II-Studie mit 106 Patienten ein molekularer Antikörper gegen Emmprin erfolgreich getestet (Chen et al 2006). Auch beim Blasenkarzinom wurden diesbezüglich erste Studien veröffentlicht. So inhibierten Xue und Kollegen in einer Studie mit 108 Patienten, die Emmprinexpression mittels der „Small-interference-RNA-Technologie“ und verminderten so deutlich sowohl die Migration von Zellen, als auch deren Proliferation. Die Arbeitsgruppe um Nawroth forscht derzeit ebenfalls an dem Biomarker Emmprin und an dessen Einsatz als Target-Molekül. Neben dem Einsatz der siRNA-Technologie untersuchen die Forscher vor allem eine Inaktivierung von Emmprin durch Kinaseinhibitoren. Diese blockieren den Signalweg, der die Emmprinexpression reguliert. (Nawroth et al 2010).

Im Hinblick auf eine therapeutische Nutzung der Biomarker sind in Zukunft noch weitere klinische Studien indiziert. Vor allem eine Kombinationstherapie aus klassischen Zytostatika, wie Gemcitabin/ Cisplatin oder Paclitaxel und einer individuellen Target-Therapie könnte vielversprechende Ergebnisse liefern.

## 5 Literaturverzeichnis

**Akhtar M**, Gallagher L, Rohan S (2006) Survivin: role in diagnosis, prognosis, and treatment of bladder cancer. *Adv Anat Pathol* 13:122-126

**Alloussi SH**, Huber S, Gakis G, Stenzl A, Schwentner C (2011) The importance of lymphadenectomy for muscle invasive transitional cell carcinoma of the human bladder - a review of the literature. *Aktuelle Urol* 42(2): 115-121

**Als AB**, Dyrskjøl L, von der Maase H et al (2007) Emmprin and survivin predict response and survival following cisplatin-containing chemotherapy in patients with advanced bladder cancer. *Clin Cancer Res* 13(15 Pt 1): 4407-4414

**Asci R**, Yildiz L, Sarikaya S, Buyukalpelli R, Yilmaz AF, Kandemir B (2001) p53 and bcl-2 overexpression as associated risk factors in patients 40 years old or less with transitional cell carcinoma of the bladder. *Urol Int* 67(1): 34-40

**Bagchi S**, Weinmann R, Raychaudhuri P (1991) The retinoblastoma protein copurifies with E2F-I, an E1A-regulated inhibitor of the transcription factor E2F. *Cell* 65(6): 1063-1072

**Baker GL**, Kahl LE, Zee BC; Stolzer BL, Agarwal AK, Medsger TA (1987) Malignancy following treatment of rheumatoid arthritis with cyclophosphamide. Long-term case-result follow-up study. *Am J Med* 83: 1-9

**Battifora H** (1986) The multitumor (sausage) block: novel method for immunohistochemical antibody testing. *Lab Invest* 55: 244-248

**Beesley AH**, Cummings AJ, Freitas JR, et al (2005) The gene expression signature of relapse in paediatric acute lymphoblastic leukaemia: implications for mechanisms of therapy failure. *Br J Haematol* 131: 447-456

**Bell JT**, Burney SW, Friedell GH (1971) Blood vessel invasion in human bladder cancer. *J Urol* 105(5): 675-678

**Bellmunt J**, Paz-Ares L, Cuello M et al (2007) Gene expression of ERCC 1 as a novel prognostic marker in advanced bladder cancer patients receiving cisplatin-based chemotherapy. *Ann Oncol* 18: 522- 528

**Bender CM**, Jones PA (1998) Molecular Genetics in Carcinoma of the Bladder. In: *Carcinoma of the Bladder: Innovations in Management*. Hrsg.: Petrovich, Z, Baert L, Brady LW, Springer Verlag Heidelberg/New York, S 37-51

**Benninghoff A** (1993) Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen 15. Auflage, Urban und Schwarzenberg München, Wien, Baltimore; S 62-66

**Billerey C**, Chopin D, Aubriot-Lorton MH, Ricol D, Gil Diez de Medina S, Van Rhijn B et al (2001) Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors. *Am J Pathol* 158: 1955-1959



**Böcker W**, Denk H, Heitz U (Hrsg): Pathologie 3. Auflage, Urban und Fischer, München, Jena **2004**, S 867-874

**Bostwick DG** and Cheng L (**2008**) Urologic Surgical Pathology, 2nd Ed. Mosby Elsevier. S 260-351

**Bracken RB**, Mackay B (**1994**) Normal structure of the Urinary Blader. Atlas of Bladder Pathology. Eds: Bracken RB, Mackay B, Igaku-Shoin

**Brandau S**, Böhle A (**2001**) Bladder cancer. I. Molecular and genetic basis of carcinogenesis. Eur Urol 39(5): 491-497

**Brennan P**, Bogillot O, Cordier S, Greiser E, Schill W, Vineis P, et al (**2000**) Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies. Int J Cancer 86: 289-294

**Bubendorf L**, Nocito A, Moch H, Sauter G (**2001**) Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. J Pathol 195: 72–79

**Burger M**, Catto J, van Oers J, Zwarthoff E, Hamdy FC, Meuth M, Azzouri AR, Cussenot O, Wild PJ, Stoehr R, Hartmann A (**2006**) Mutation of the FGFR3 oncogene is an independent and favorable prognostic factor for tumor-specific survival in patients with urothelial carcinoma of the upper urinary tract. Verh Dtsch Ges Pathol. 90: 244-252

**Cappellen D**, De Oliveira C, Ricol D et al (**1999**) Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. Nat Genet 23: 18–20

**Cobo M**, Isla D, Massuti B, Montes A, Sanchez JM, Provencio M, Vinolas N, Paz-Ares L, Lopez-Vivanco G, Munoz MA, et al (**2007**) Customizing cisplatin based on quantitative excision repair cross-complementing 1 mRNA expression: a phase III trial in non–small-cell lung cancer. J Clin Oncol 25: 2747–2754

**Cole P** (**1971**) Coffee-drinking and cancer of the lower urinary tract. Lancet I: 1335

**Cooke PW**, James ND, Ganesan R, Burton A, Young LS, Wallace DM (**2000**) Bcl-2 expression identifies patients with advanced bladder cancer treated by radiotherapy who benefit from neoadjuvant chemotherapy. BJU Int 85(7): 829-835

**Cordon-Cardo C**, Wartinger D, Petrylak D, Dalbagni G, Fair WR, Fuks Z, Reuter VE (**1992**) Altered expression of the retinoblastoma gene product: prognostic indicator in bladder cancer. J Natl Cancer Inst 84(16): 1251-1256

**Czerniak B**, Chaturvedi V, Li L, Hodges S, Johnston D, Roy JY, Luthra R, Logothetis C, Von Eschenbach AC, Grossman HB, Benedict WF, Batsakis JG (**1999**) Superimposed histologic and genetic mapping of chromosome 9 in progression of human urinary bladder neoplasia: implications for a genetic model of multistep urothelial carcinogenesis and early detection of urinary bladder cancer. Oncogene 18: 1185-1196

**Dalbagni G**, Presti J, Reuter V, Fair WR, Cordon-Cardo C (**1993**) Genetic alterations in bladder cancer. Lancet 342: 469-471

**Davidson B**, Goldberg I, Berner A, Kristensen GB, Reich R (2003) EMMPRIN (extracellularmatrixmetalloproteinase inducer) is a novel marker of poor outcome in serous ovarian carcinoma. *Clin Exp Metastasis* 20: 161-169

**Dean NR**, Newman JR, Helman EE, Zhang W, Safavy S, Weeks DM, Cunningham M, Snyder LA, Tang Y, Yan L, McNally LR, Buchsbaum DJ, Rosenthal EL (2009) Anti-EMMPRIN monoclonal antibody as a novel agent for therapy of head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 15(12): 4058-4065

**Denzinger S**, Burger M, Fritsche HM, Bertz S, Hofstädter F, Wieland WF, Hartmann A, Otto W (2009) Prognostic value of histopathological tumour growth patterns at the invasion front of T1G3 urothelial carcinoma of the bladder. *Scand J Urol Nephrol* 43(4): 282-287

**Eble JE**, Sauter G, Epstein U, Sesterhenn IA (eds) (2004) Tumours of the urinary system and male genital organs. WHO classification of tumours. IARC Press, Lyon

**Epstein, JI**, Amin MB, Reuter, VP, Mostofi FK, and th871-875e Bladder Consensus (1998) The World Health Organization/International Society of Urological Pathology Consensus Classification of Urothelial (Transitional Cell) Neoplasms of the Urinary Bladder. *Am J Surg Pathol* 22(12): 1435-1448

**Esrig D**, Elmajian D, Groshen S, Freeman JA, Stein JP (1994) Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *New Engl J Med* 331: 1259-64

**Giannopoulos A**, Manousaka T, Mitopoulos D et al (2000) Comparative evaluation of the BTastat test, NMP22, and voided urine cytology in the detection of primary and recurrent bladder tumors. *Urology* 55(6): 871-875

**Giannopoulou I**, Nakopoulou L, Zervas A, Lazaris AC, Stravodimos C, Giannopoulos A, Davaris PS (2002) Immunohistochemical study of pro-apoptotic factors Bax, Fas and CPP32 in urinary bladder cancer: prognostic implications. *Urol Res* 30(5): 342-345

**Gillett CE**, Springall RJ, Barnes DM, Hanby AM (2000) Multiple tissue core arrays in histopathology research: a validation study. *J Pathol* 192: 549- 553

**Gontero P**, Casetta G, Zitella A, Ballario R, Pacchioni D, Magnani C, Muir GH (2000) Evaluation of p53 protein overexpression. Ki-67 proliferative activity and mitotic index as markers of tumour recurrence in superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur Urol* 38: 287-96

**Gonzalez-Zulueta M**, Shibata A, Ohneseit PF, Spruck CH, Busch C, Shamaa M, El-Baz M, Nichols PW, Gonzalgo ML, Elbaz M (1995) High frequency of chromosome 9p allelic loss and CDKN2 tumor suppressor gene alterations in squamous cell carcinoma of the bladder. *J Natl Cancer Inst* 87: 1383-1393

**Greer CE**, Wheeler CM, Manos MM (1994) Sample Preparation and PCR Amplification from Paraffin-embedded Tissues. *PCR Methods Applic* 3(5): 113-122

**Grignon DJ** (1997): Neoplasms of the urinary bladder. In: *Urologic Surgical Pathology*. Eds.: Bostwick DG, Eble JN, Mosby-Year Book, pp: 214-305

**Hartmann A**, Moser K, Kriegmair M, Hofstetter A, Hofstädter F, Knüchel R (1999) Frequent genetic alterations in simple urothelial hyperplasias of the bladder in patients with papillary urothelial carcinoma. *Am J Pathol* 154: 721-727

**Hartmann A**, Rösner U, Schlake G, Dietmaier W, Zaak D, Hofstädter F, Knüchel R (2000) Clonality and genetic divergence in multifocal low-grade superficial urothelial carcinoma as determined by chromosome 9 and p53 deletion analysis. *Lab Invest* 80: 709-718

**Hartmann A**, Hofstädter F, Knüchel R (2002) Molekulare Pathogenese des Harnblasenkarzinoms und pathologische Diagnostik. *Onkologe* 8: 919-928

**Harris AL**, Neal DE (1992): Bladder cancer field versus clonal origin. *N Engl J Med* 326: 759-761

**Harris CC** (1996) Structure and Function of the p53 Tumor Suppressor Gene: Clues for Rational Cancer Therapeutic Strategies. *J Natl Cancer Inst* 88(20): 1442-51

**Hecht SS**, Tso TC, Hoffmann D (1976) Selective reduction of tumor-genicity of tobacco smoke. IV Approaches to the reduction of N-nitosamines and aromatic amines. *Proceedings of Third World Conference of smoking and health. Dept Health Education and Welfare Publ No (NH) 76: 535*

**Helpap B** (1993) Atlas der Pathologie urologischer Tumoren. Springer Verlag Berlin/Heidelberg/New York, S 53-69

**Heney NM**, Daly J, Prout GR jr, Nieh PT, Heaney JA, Trebeck NE (1978) Biopsy of apparently normal urothelium in patients with bladder carcinoma. *J Urol* 120: 559-560

**Hermanek P**, Hutter RVP, Sobin LH, Wagner G, Wittekind C (Hrsg) (1997) TNM Atlas. 4. Auflage. Springer Verlag, Berlin – Heidelberg – New York, S 311

**Hoffmann AC**, Wild P, Leicht C, Bertz S, Danenberg KD, Danenberg PV, Stöhr R, Stöckle M, Lehmann J, Schuler M, Hartmann A (2010) MDR1 and ERCC1 expression predict outcome of patients with locally advanced bladder cancer receiving adjuvant chemotherapy. *Neoplasia* 12(8): 628-636

**Hoffmann D**, Masuda Y, Wynder EL (1969) Alpha-naphtylamine and beta-naphtylamine in cigarette smoke. *Nature* 221: 254

**Horvath L**, Henshall S (2001) The application of tissue microarrays to cancer research. *Pathology* 33: 125–129

**Hueper WC**, Wiley FH, Wolfe HD (1938) Experimental production of bladder tumours in dogs by administration of beta-naphtylamine. *J Indust Hyg Toxiol* 20/1: 46

**Hussain SA**, Ganesan R, Hiller L, Murray PG, el-Magraby MM, Young L, James ND (2003) Proapoptotic genes BAX and CD40L are predictors of survival in transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Cancer* 88(4): 586-592

**Hussain SA**, Ganesan R, Hiller L, Cooke PW, Murray P, Young LS, James ND (2003) BCL2 expression predicts survival in patients receiving synchronous chemoradiotherapy in advanced transitional cell carcinoma of the bladder. *Oncol Rep* 10(3): 571-576

**Ishibashi Y**, Matsumoto T, Niwa M, et al (2004) CD147 and matrix metalloproteinase-2 protein expression as significant prognostic factors in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 101: 1994-2000

**Jebar AH**, Hurst CD, Tomlinson DC, Johnston C, Taylor CF, Knowles MA (2005) FGFR3 and Ras gene mutations are mutually exclusive genetic events in urothelial cell carcinoma. *Oncogene* 24(33): 5218-525

**Junqueira LC**, Carneiro J (2004) *Histologie*, 6. Auflage, Springer Verlag Berlin

**Kanekura T**, Chen X, Kanzaki T (2002) Basigin (CD147) is expressed on melanoma cells and induces tumor cell invasion by stimulating production of matrix metalloproteinases by fibroblasts. *Int J Cancer* 99: 5520-528

**Kanekura T**, Chen X (2010) CD147/basigin promotes progression of malignant melanoma and other cancers. *J Dermatol Sci* 57(3): 149-154

**Karl A**, Zaak D, Tilki D et al (2008) Diagnostik des Harnblasenkarzinoms. *Der Urologe* 47: 357-367

**Karoui M**, Hofmann-Radvanyi H, Zimmermann U et al (2001) No evidence of somatic FGFR3 mutation in various types of carcinoma. *Oncogene* 20: 5059–5061

**Kataja VV**, Pavlidis N (2005) ESMO Minimum Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up of invasive bladder cancer. *Ann Oncol* 16 Suppl 1: 43-44

**Keen AJ**, Knowles MA (1994) Definition of two regions of deletion on chromosome 9 in carcinoma of the bladder. *Oncogene* 9: 2083-2088

**Kennedy SM**, O'Driscoll L, Purcell R, et al (2003) Prognostic importance of survivin in breast cancer. *Br J Cancer* 88: 1077-1083

**King ED**, Matteson J, Jacobs SC, Kyprianou N (1996) Incidence of apoptosis, cell proliferation and bcl-2 expression in transitional cell carcinoma of the bladder: association with tumor progression. *J Urol* 155(1): 316-320

**Kinzler KW**, Vogelstein B (1997) Cancer susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 386: 761-763

**Knudson AG** (1985) Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res* 45(4): 1437-43

**Knowles MA** (1995) Molecular Genetics of bladder cancer. *British Journal of Urology* 75: 57

**Knowles MA** (1998) Molecular Genetics of bladder cancer: Pathways of Development and Progression. *Cancer Surveys* 31:49

- Knowles MA (2001)** What we could do now: Molecular pathology of bladder cancer. *Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology* 54: 215-221
- Knowles MA, Platt FM, Ross RL, Hurst CD (2009)** Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway activation in bladder cancer. *Cancer Metastasis Rev* 28 (3-4): 305-16
- Knüchel R, Hofstädter F (2004)** Ableitende Harnwege. In: Böcker W, Denk H, Heitz PU (Hrsg): *Pathologie*. 3. Auflage. Verlag Urban & Fischer, München - Jena, S 867f.
- Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP (1998)** Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 4: 844-847
- Korkolopoulou P, Lazaris ACh, Konstantinidou AE, Kavantzias N, Patsouris E, Christodoulou P, Thomas-Tsagli E, Davaris P (2002)** Differential expression of bcl-2 family proteins in bladder carcinomas. Relationship with apoptotic rate and survival. *Eur Urol* 4 (3): 274-283
- Kren L, Brazdil J, Hermanova M, et al (2004)** Prognostic significance of anti-apoptosis proteins survivin and bcl-2 in non-small cell lung carcinomas: a clinicopathologic study of 102 cases. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 12: 44-49
- Krüger S, Noack F, Böhle A, Feller AC (2004)** Histologic tumor growth pattern is significantly associated with disease-related survival in muscle-invasive transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Oncol Rep* 12(3): 609-613
- Kunze E, Calude J, Frentzel-Beyme R (1986)** Association of cancer at the lower urinary tract with consumption of alcoholic beverages – a case control study. *Carcinogenesis* 7: 163
- Kunze E, Chang-Claude J, Frentzel-Beyme R (1992)** Life style and occupational risk factors of bladder cancer in Germany. *Cancer* 69(7): 1776-1790
- Kueck U (2005)** *Praktikum der Molekulargenetik*. Springer Verlag Berlin/Heidelberg/New York. S 222
- Langner C, Hutterer G, Chromecki T, Rehak P, Zigeuner R (2006)** Patterns of invasion and histological growth as prognostic indicators in urothelial carcinoma of the upper urinary tract. *Virchows Arch* 448(5): 604-611
- Lee JP, Chang KH, Han JH, Ryu HS (2005)** Survivin, a novel anti-apoptosis inhibitor, expression in uterine cervical cancer and relationship with prognostic factors. *Int J Gynecol Cancer* 15: 113-119
- Lehmann J, Retz M, Stöckle M (2002)** Chemotherapy in the post-MVAC era. The case for adjuvant chemotherapy. *World J Urol* 20: 144-150
- Lehmann J, Retz M, Stöckle M (Hrsg.) (2005)** *Blasenkarzinom*. Springer Medizin Verlag Heidelberg
- Lehmann J, Retz M, Wiemers C et al (2005)** Adjuvant cisplatin plus methotrexate versus Methotrexate, vinblastine, epirubicin, and cisplatin in locally advanced bladder cancer: results of a randomized, multicenter, phase III trial (AUO-AB 05/95). *J Clin Oncol* 23: 4963–4974

- Leissner J**, Koeppen C, Wolf HK (2003) Prognostic significance of vascular and perineural invasion in urothelial bladder cancer treated with radical cystectomy. *J Urol* 169(3): 955-960
- Liedl B**, Zimmermann F in: Blasenkarzinom. Eds.: Lehmann, Retz, Stöckle (2005) Springer Medizin Verlag Heidelberg. S 60-68
- Lipponen PK** (1993) Over-expression of p53 nuclear oncoprotein in transitional-cell bladder cancer and its prognostic value. *Int J Cancer* 53: 365-370
- Lipponen PK**, Aaltomaa S, Eskelinen M (1996) Expression of the apoptosis suppressing bcl-2 protein in transitional cell bladder tumours. *Histopathology* 28(2): 135-140
- Liukkonen TJ**, Lipponen PK, Helle M, Jauhiainen KE (1997) Immunoreactivity of bcl-2, p53 and EGFr is associated with tumor stage, grade and cell proliferation in superficial bladder cancer. Finnbladder III Group. *Urol Res* 25(1): 1-7
- Llopis J**, Alcaraz A, Ribal MJ, Sole M, Ventura PJ, Barranco MA, Rodriguez A (2000) p53 expression predicts progression and poor survival in T1 bladder tumours. *Eur Urol* 37: 644-653
- Logothetis CJ**, Xu HJ, Ro JY, Hu SX, Sahin A, Ordonez N, Benedict WF (1992) Altered expression of retinoblastoma protein and known prognostic variables in locally advanced bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 84(16): 1256-1261
- Lopez-Beltran A**, Pacelli A, Rothenberg HJ, Wollan PC, Zincke H, Blute ML, Bostwick DG (1998) Carcinosarcoma and sarcomatoid carcinoma of the bladder: clinicopathological study of 41 cases. *J Urol* 159: 1497-1503
- López-Knowles E**, Hernández S, Malats N, Kogevinas M, Lloreta J, Carrato A, Tardón A, Serra C, Real FX (2006) PIK3CA mutations are an early genetic alteration associated with FGFR3 mutations in superficial papillary bladder tumors. *Cancer Res* 66 (15): 7401-7404
- Lotan Y**, Gupta A, Shariat SF, Palapattu GS, Vazina A, Karakiewicz PI, Bastian PJ, Rogers CG, Amiel G, Perotte P, Schoenberg MP, Lerner SP, Sagalowsky AI (2005) Lymphovascular invasion is independently associated with overall survival, cause-specific survival, and local and distant recurrence in patients with negative lymph nodes at radical cystectomy. *J Clin Oncol* 23(27): 6533-6539
- Merlin F**, Sava T, Porcaro A, Ghimenton C, Frisinghelli M, Manno P, Griso C, Bassetto M, Comunale L, Cetto G (2004) Transitional cell carcinomas of the upper urothelial tract: A retrospective analysis. *J Clin Oncol* 22: 14S: abstract 4740
- Metzger R**, Leichman CG, Danenberg KD, Danenberg PV, Lenz HJ, Hayashi K, Groshen S, Salonga D, Cohen H, Laine L, et al (1998) ERCC1 mRNA levels complement thymidylate synthase mRNA levels in predicting response and survival for gastric cancer patients receiving combination cisplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol* 16: 309–316
- Mian C**, Lodde M, Comploj E, Negri G, Egarter-Vigl E, Lusardi L, Palermo S, Marberger M, Pycha A (2003) Liquidbased cytology as a tool for the performance of uCyt+™ and UroVysion® Multicolour-FISH in the detection of urothelial carcinoma. *Cytopathology* 14: 338-342

**Misra S**, Ghatak S, Zoltan-Jones A, Toole BP (2003) Regulation of multidrug resistance in cancer cells by hyaluronan. *JBiol Chem* 278: 25285-25288

**Miyamoto H**, Shuin T, Ikeda I, Hosaka M, Kubota Y (1996) Loss of heterozygosity at the p53, RB, DCC and APC tumor suppressor gene loci in human bladder cancer. *J Urol* 155: 1444-1447

**Miyao N**, Tsai YC, Lerner SP, Olumi AF, Spruck CH, Gonzalez-Zulueta M, Nichols PW, Skinner DG, Jones PA (1993) Role of chromosome 9 in human bladder cancer. *Cancer Res* 53: 4066-4070

**Moch H**, Kononen J, Kallionemi OP et al (2001) Tissue microarrays: what will they bring to molecular and anatomic pathology? *Advances in Anatomic Pathology* 8(1): 14-20

**Mostofi FK**, Davis CJ, Sesterhenn IA (1999) *Histological Typing of Urinary Bladder Tumours*. 2.Auflage, Springer Verlag Berlin/Heidelberg/New York

**Muraoka K**, Nabeshima K, Murayama T, Biswas C, Kono M (1993) Enhanced expression of a tumor-cell derived collagenase-stimulatory factor in urothelial carcinoma: its usefulness as a tumor marker for bladder cancers. *Int J Cancer* 55: 19-26

**Nawroth R**, Hartmann A, Wild P, Lehmann J, Stöhr R, Gschwend JE, Retz M (2010) EMMPRIN (CD147) Ein prognostischer und potenzieller therapeutischer Marker im Urothelkarzinom. *Pathologe Suppl* 2: 251-254

**Nawroth R**, Stöhr R, Hartmann A, Gschwend JE, Retz M (2008) EMMPRIN(CD147). Ein neues Schlüsselprotein in der Tumorprogression des Harnblasenkarzinoms. *Urologe A* 47(9): 1152-1156

**Nocito A**, Kononen J, Kallioniemi O-P, Sauter G (2001) Tissue Microarrays (TMAs) for high-throughput molecular pathology research. *Int J Cancer* 94: 1-5

**Ong F**, Moonen LM, Gallee MP, ten Bosch C, Zerp SF, Hart AA, Bartelink H, Verheij M (2001) Prognostic factors in transitional cell cancer of the bladder: an emerging role for Bcl-2 and p53. *Radiother Oncol* 61(2): 169-175

**Orntoft TF**, Wolf H (1998) Molecular alterations in bladder cancer. *Urol Res* 26: 223

**Oosterlinck W**, Loebl B, Jakse G, Malmstrom PU, Stockle M, Sternberg C (2002) Guidelines on bladder cancer. In: *Eur Urol* 41 (2): 105-112

**Park S**, Hong B, Kim CS, Ahn H (2004) The impact of tumor location on prognosis of transitional cell carcinoma of the upper urinary tract. *J Urol* 171: 621-625

**Platt FM**, Hurst CD, Taylor CF, Gregory WM, Harnden P, Knowles MA. (2009) Spectrum of phosphatidylinositol 3-kinase pathway gene alterations in bladder cancer. *Clin Cancer Res* 15(19): 6008-6017

**Pollack A**, Wu CS, Czerniak B, Zagars GK, Benedict WF, McDonnell TJ (1997) Abnormal bcl-2 and pRb expression are independent correlates of radiation response in muscle-invasive bladder cancer. *Clin Cancer Res* 3(10): 1823-1829

**Quek ML**, Stein JP, Nichols PW, Cai J, Miranda G, Groshen S, Daneshmand S, Skinner EC, Skinner DG (2005) Prognostic significance of lymphovascular invasion of bladder cancer treated with radical cystectomy. *J Urol* 174(1): 103-106

**Reed JC** (1995) Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance. *Curr Opin Oncol* 7: 541-546

**Reznikoff CA**, Belair CD, Yeager TR, Savelieva E, Blesloch RH, Puthenveetil JA, Cuthill S (1996) A molecular genetic model of human bladder cancer pathogenesis. *Semin Oncol* 23: 571-584

**Richie JP**, Shipley WU & Yagoda A (1989) Cancer of the bladder. In: *Cancer Principles and Practice of Oncology*, De Vita VT, Helman S and Rosenberg SA (eds), pp. 1008–1022. JB Lippincott: Philadelphia

**Riethdorf S**, Reimers N, Assmann V et al (2006) High incidence of EMMPRIN expression in human tumors. *Int J Cancer* 119(8): 1800–1810

**Rousseau F**, Saugler P, LeMerrer M, Munnich A, Delezoide AL, Maroteaux P et al (1995) Stop codon FGFR3 mutations in thanatophoric dwarfism type 1. *Nat Genet* 10: 11-12

**Rübben H**, Otto T (1997) Harnblasenkarzinom. In: *Uroonkologie*. Hrsg.: Rübben, H Springer-Verlag Berlin/Heidelberg/New York, S 57-63

**Ruppert JM**, Tokino K, Sidransky D (1993) Evidence for two bladder cancer suppressor loci on human chromosome 9. *Cancer Res* 53: 5093-5095

**Sameshima T**, Nabeshima K, Toole BP, et al (2000) Expression of emmprin (CD147), a cell surface inducer of matrix metalloproteinases, in normal human brain and gliomas. *Int J Cancer* 88: 21-27

**Sauter G**, Moch H, Carroll P, Kerschmann R, Mihatsch MJ, Waldman FM (1995) Chromosome-9 loss detected by fluorescence in situ hybridization in bladder cancer. *Int J Cancer* 64: 99-103

**Saxman SB**, Propert KJ, Einhorn LH et al (1997) Long-term follow-up of a phase III intergroup study of cisplatin alone or in combination with methotrexate, vinblastine, and doxorubicin in patients with metastatic urothelial carcinoma: a cooperative group study. *J Clin Oncol* 15: 2564–2569

**Schmitz-Dräger BJ**, Goebell PJ, Ebert T, Fradet Y (2000) p53 immunohistochemistry as a prognostic marker in bladder cancer. Playground for urology scientists? *Eur Urol* 38: 691-699

**Schraml P**, Kononen J, Bubendorf L, Moch H, Bissig H, Nocito A, Mihatsch MJ, Kallioniemi OP, Sauter G (1999) Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types. *Clin Cancer Res* 5: 1966-1975

**Shiina H**, Igawa M, Nagami H, Yagi H, Urakami S, Yoneda T, Shirakawa H, Ishibe T, Kawanishi M (1996) Immunohistochemical analysis of proliferating cell nuclear antigen, p53 protein and nm23 protein, and nuclear DNA content in transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer* 78(8): 1762-1774



**Sibley K**, Stern P and Knowles MA (2001) Frequency of fibroblast growth factor receptor 3 mutations in sporadic tumours. *Oncogene* 20: 4416-4418

**Sidhu SS**, Nawroth R, Retz M, Lemjabbar-Alaoui H, Dasari V, Basbaum C (2010) EMMPRIN regulates the canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway, a potential role in accelerating lung tumorigenesis. *Oncogene* 29(29): 4145-4156

**Sidransky D**, Frost P, Von Eschenbach A (1992) Clonal origin bladder cancer. *N Engl J Med* 326: 737-740

**Simon G**, Sharma A, Li X, Hazelton T, Walsh F, Williams C, Chiappori A, Haura E, Tanvetyanon T, Antonia S, et al (2007) Feasibility and efficacy of molecular analysis–directed individualized therapy in advanced non–small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 25: 2741–2746

**Simoneau M**, Aboukassim TO, LaRue H, Rousseau F, Fradet Y (1999) Four tumor suppressor loci on chromosome 9q in bladder cancer: evidence for two novel candidate regions at 9q22.3 and 9q31. *Oncogene* 18: 157-163

**Skinner DG**, Daniels JR, Russell CA et al (1991) The role of adjuvant chemotherapy following cystectomy for invasive bladder cancer: a prospective comparative trial. *J Urol* 145: 459–64

**Smith SC**, Baras AS, Dancik G, Ru Y, Ding KF, Moskaluk CA, Fradet Y, Lehmann J, Stöckle M, Hartmann A, Lee JK, Theodorescu D (2011) A 20-gene model for molecular nodal staging of bladder cancer: development and prospective assessment. *Lancet Oncol* 12(2): 137-413

**Soloway MS**, Jordan AM, Murphy WM (1989) Rationale for intravesical chemotherapy in the treatment and prophylaxis of superficial transitional cell carcinoma. *Prog Clin Biol Res* 310: 215-236

**Spruck CH**, Ohneseit PF, Gonzalez-Zulueta M, Esrig D, Miyao N, Tsai YC, Lerner SP, Schmutte C, Yang AS, Cote R (1994) Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res* 54: 784-788

**Stadler WM**, Lerner SP, Groshen S, Stein JP, Shi SR, Raghavan D, Esrig D, Steinberg G, Wood D, Klotz L, Hall C, Skinner DG, Cote RJ (2011) Phase III study of molecularly targeted adjuvant therapy in locally advanced urothelial cancer of the bladder based on p53 status. *J Clin Oncol* 29(25): 3443-93449

**Stavropoulos NE**, Filiadis I, Ioachim E, Hastazeris K, Tsimaris I, Kalogeras D, Stefanaki S Agnantis Nu (2002) Prognostic significance of p53, bcl-2 and Ki-67 in high risk superficial bladder cancer. *Anticancer Res* 22: 3759- 3764

**Stoehr R**, Hartmann A (2007) Histopathologie und Molekulargenetik des Harnblasenkarzinoms. *Der Onkologe* 13: 1058-1066

**Stöckle M**, Meyenburg W, Wellek S, Voges G, Gertenbach U, Thuroff JW, Huber C, Hohenfellner R (1992) Advanced (stages pT3b, pT4a, pN1 and pN2) improved survival after

radical cystectomy and 3 bladder cancer adjuvant cycles of chemotherapy. Results of a controlled prospective study. *J Urol* 148: 302–306

**Stratton MR (1996)** Mechanisms of activation and inactivation for dominant oncogenes and tumour suppressor genes. In: JR Yarnold, Stratton M, TJ McMillan, (editors). *Molecular Biology for Oncologists*: Chapman & Hall. p16

**Stryer L**, Biochemie. 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg/Berlin/Oxford, S 127-139, **1996**

**Torhorst J**, Bucher C, Kononen J, Haas P, Zuber M, Kochli OR, Mross F, Dieterich H, Moch H, Mihatsch M, Kallioniemi OP, Sauter G (**2001**) Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am J Pathol* 159: 2249-2256

**Toncheva DI**, Zaharieva BM (**2003**) High-throughput Tissue Microarray Analysis of erbB-2 gene amplification in urinary bladder cancer. *Urologica Internationalis* 71: 408-411

**Van Oers JM**, Lurkin I, van Exsel AJ, Nijsen Y, van Rhijn BW, van der Aa MN, Zwarthoff EC (**2005**) A simple and fast method for the simultaneous detection of nine fibroblast growth factor receptor 3 mutations in bladder cancer and voided urine. *Clin Cancer Res* 11 (21): 7743-7748

**Van Oers JM**, Wild PJ, Burger M, Denzinger S, Stoehr R, Roskopf E, Hofstaedter F, Steyerberg EW, Klinkhammer-Schalke M, Zwarthoff EC, van der Kwast TH, Hartmann A (**2007**) FGFR3 mutations and normal CK20 staining pattern define low grade noninvasive urothelial bladder tumours. *Eur Urol* 52(3): 760-768

**Van Oers JM**, Zwarthoff EC, Rehman I, Azzouzi AR, Cussenot O, Meuth M, Hamdy FC, Catto JW (**2009**) FGFR3 mutations indicate better survival in invasive upper urinary tract and bladder tumours. *Eur Urol* 55 (3): 650-658

**Van Rhijn BW**, Lurkin I, Radvanyi F, Kirkels WJ, van der Kwast TH, Zwarthoff EC (**2001**) The fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) mutation is a strong indicator of superficial bladder cancer with low recurrence rate. *Cancer Res* 61: 1265-1268

**Vineis P**, Piratsu R (**1997**) Aromatic amines and cancer. *Cancer Causes Control* 8: 346-355

**Von der Maase H**, Hansen SW, Roberts JT et al (**2000**) Gemcitabine and Cisplatin Versus Methotrexate, Vinblastine, Doxorubicin, and Cisplatin in Advanced or Metastatic Bladder Cancer: Results of a Large, Randomized, Multinational, Multicenter, Phase III Study. *J Clin Oncol* 18: 3068-77

**Wittekind Ch**, Nenning H (**1997**) Pathologie und Prognosefaktoren des Harnblasenkarzinoms. *Onkologie* 3: 227–235

**Wolf HK**, Stöber C, Hohenfellner R, Leissner J (**2001**) Prognostic value of p53, p21/WAF1, Bcl-2, Bax, Bak and Ki-67 immunoreactivity in pT1 G3 urothelial bladder carcinomas. *Tumour Biol* 22(5): 328-336

**Xue YJ**, Lu Q, Sun ZX (**2010**) CD147 overexpression is a prognostic factor and a potential therapeutic target in bladder cancer. *Med Oncol* (Epub ahead of print)

**Zheng HC**, Takahashi H, Murai Y et al (2006) Upregulated EMMPRIN/CD147 might contribute to growth and angiogenesis of gastric carcinoma: a good marker for local invasion and prognosis. Br J Cancer 95: 1371-1378

**Zhong WD**, Chen QB, Ye YK, Han ZD, Bi XC, Dai QS, Liang YX, Zeng GH, Wang YS, Zhu G, Chen ZN, He HC (2010) Extracellular matrix metalloproteinase inducer expression has an impact on survival in human bladder cancer. Cancer Epidemiol 34(4): 478-482

## 6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Schematischer Querschnitt durch die männliche Harnblase (Benninghoff 1993).....	7
Abbildung 1-2: Querschnitt durch die Harnblasenwand; Hämatoxylin/Eosin-Färbung; x20.....	8
Abbildung 1-3: Der Vergleich zwischen den Oberflächenanteilen des Urothels und der Inzidenzrate von Urothelkarzinomen zeigt eine gute Übereinstimmung (aus Rübben und Otto, 1997).....	13
Abbildung 1-4: Normalurothel, Hämatoxylin/Eosin-Färbung, x400.....	15
Abbildung 1-5: Urotheliale Hyperplasie, x200.....	15
Abbildung 1-6: Urotheliale Dysplasie, x400.....	15
Abbildung 1-7: Papilläres Harnblasenkarzinom, Übersicht, x200.....	19
Abbildung 1-8: Papillärer Urotheltumor, x200.....	19
Abbildung 1-9: Carcinoma in situ, x200.....	19
Abbildung 1-10: Carcinoma in situ, x400.....	19
Abbildung 1-11: T-Stadien des Harnblasenkarzinoms mit schematischer Darstellung der Invasionstiefe in die Blasenwand (Hermanek et al 1997).....	20
Abbildung 1-12: Funktion von p53 beim Auftreten eines DNA-Schadens in Bezug auf Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur und Apoptose;.....	26
Abbildung 1-13 PI3K/AKT/mTOR-Signalfad (Knowles MA et al 2009).....	30
Abbildung 1-14 Prozentuale Häufigkeit chromosomaler Deletionen beim Blasenkarzinom (nach Bender und Jones, 1998).....	31
Abbildung 1-15: Modell der Pathogenese des Urothelkarzinoms. PUNLMP = Papillary Urothelial Neoplasm of Low Malignant Potential, LG = Low Grade, HG = High Grade.....	33
Abbildung 2-1: „MagNa Pure LC“ von „Roche Applied Sciences“.....	45
Abbildung 2-2: Markierung der Gewebeareale.....	49
Abbildung 2-3: Markierungsübertragung auf Paraffinblock.....	50
Abbildung 2-4: Gewinnung der Gewebestanzen.....	50
Abbildung 2-5: Befüllen des Gefäßes.....	51
Abbildung 3-1: Klinisch pathologische Daten.....	58
Abbildung 3-2: Ergebnisse der immunhistochemischen Analysen.....	60
Abbildung 3-3: Emmprinexpression im Bezug zur Blutgefäßinvasion.....	62
Abbildung 3-4: Univariate Überlebensanalysen im Bezug zu Lymphknoteninvasion.....	63
Abbildung 3-5: Univariate Überlebensanalysen im Bezug zu Gefäßinvasion.....	63
Abbildung 3-6: Univariate Überlebensanalysen im Bezug zum Wachstumsmuster und Chemotherapiechema.....	63

## 7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Für den Menschen gesicherte Blasenkarzinogene aus der Gruppe der aromatischen Amine (Vineis et al 1997) .....	11
Tabelle 1-2: verschiedene Differenzierungsformen .....	18
Tabelle 1-3: TNM-Klassifikation 2002 - Harnblasenkarzinom.....	21
Tabelle 1-4: WHO-Grading im Jahr 1973 und im Jahr 2004.....	22
Tabelle 2-1: Übersicht über die Anzahl der jeweiligen Stadien und Gradings in der Versuchsgruppe .....	43
Tabelle 2-2: Master-Mix für die Standard-PCR-Reaktion .....	47
Tabelle 2-3: Standard-PCR-Programm .....	48
Tabelle 3-1 : Patientendaten und Tumorcharakterisierung .....	56
Tabelle 3-2: Ergebnisse der immunhistochemischen Analysen.....	59
Tabelle 3-3: Emmprin Immunreaktion im Bezug zu klinisch-pathologischen Daten und zu immunhistochemischen Markern .....	62
Tabelle 3-4: Univariate Analysen von Faktoren, welche möglicherweise das Überleben und das Tumorwachstum beeinflussen .....	65
Tabelle 3-5: Multivariate cox-regression Analyse .....	68

## 8 Anhang

### 8.1 Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Arndt Hartmann für die Bereitstellung des Dissertationsthemas und seine Betreuung ganz herzlich bedanken. Durch die gute Zusammenarbeit beim Auswerten der Schnitte und sein konstruktives Feedback beim Verfassen dieser Doktorarbeit hat er mich tatkräftig unterstützt.

Für die praktische Durchführung im Labor gilt mein besonderer Dank Frau Monika Kerscher, die mir bei der Erstellung der TMAs eine sehr große Hilfe war. Es hat großen Spaß gemacht mit ihr zusammenzuarbeiten.

Auch bei Frau Dr. Simone Bertz möchte ich mich für die Hilfe bei der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen bedanken.

Herr PD Dr. Peter Wild hat für mich die statistischen Berechnungen durchgeführt und mir viele wertvolle Ratschläge für die Erstellung der Arbeit gegeben. Er konnte mir meine Fragen stets schnell und unkompliziert beantworten und war für mich ein wichtiger Ansprechpartner. Hierfür ganz herzlichen Dank.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht und mich stets unterstützt haben. Durch ihren Rückhalt haben sie mir vieles erleichtert und zum Gelingen meiner Ausbildung enorm beigetragen.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meinem Lebensgefährten Christoph dafür, dass er immer für mich da war, mich in schwierigen Situationen unterstützt und ermutigt hat und mir mit seinen Ideen und Anregungen beim Schreiben der Arbeit sehr oft weitergeholfen hat.

## 8.2 Curriculum vitae

### **Persönliche Informationen**

- Name: Christina Leicht
- Geburtsdatum: 08.12.1981
- Geburtsort: Lauingen (Donau)
- Familienstand: Ledig
- Nationalität: Deutsch

### **Schullaufbahn**

- 1987 – 1991 Volksschule in Höchstädt a. d. Donau
- 1991 – 2001 Johann-Michael Sailer Gymnasium in Dillingen
- 2001 Abitur

### **Studium**

- Oktober 2001 – April 2002:  
Zahnmedizinstudium an der J.W. Goethe-Universität in Frankfurt a. Main
- April 2002 – Dezember 2007:  
Zahnmedizinstudium an der Universität Regensburg
  - Oktober 2002:  
Vorphysikum
  - September 2004:  
Physikum
  - Juli 2007 – November 2007:  
Staatsexamensprüfungen
  - Dezember 2007:  
Erhalt der zahnärztlichen Approbation

### **Beruflicher Werdegang**

- Januar 2008 – Dezember 2009:  
Vorbereitungsassistentin in Schwenningen
- Januar 2010 – Oktober 2011:  
Zahnärztin in Miesbach

### 8.3 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für die Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den

---

Christina Leicht